Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Marek Adamowski

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



Praca doktorska wykonana w Zakładzie Immunologii i Patologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Promotor: dr hab. n. wet. António Miguel Galvão

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki:
SONATA 5 Rola leptyny w patogenezie dysfunkcji jajników podczas rozwoju otyłości
(2014/15/D/NZ4/01152)

Olsztyn 2023

Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania, Sz. P. dr hab. n. wet. António Galvão za jego nieocenione wsparcie merytoryczne i cenne wskazówki, których udzielał mi podczas wykonywania eksperymentów, a także za zaangażowanie bez którego realizacja niniejszego projektu nie byłaby możliwa.

Chciałbym również podziękować Sz.P. Prof. dr hab. n. wet. Dariuszowi Skarżyńskiemu oraz wszystkim pracownikom Zakładu Immunologii i Patologii Rozrodu, a także pozostałym pracownikom Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie z którymi miałem okazję współpracować, za stworzenie wspaniałej i przyjaznej atmosfery w miejscu pracy.

Szczególne podziękowania składam mojej Żonie Monice, Synkowi Albercikowi, Córeczce Agatce, Rodzicom za ogromne wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość, jakie mi okazywali podczas pisania rozprawy doktorskiej.

Część wyników badań ujętych w niniejszej rozprawie doktorskiej opublikowano:

Adamowski M, Wołodko K, Oliveira J, Castillo-Fernandez J, Murta D, Kelsey G, Galvão AM. Leptin Signaling in the Ovary of Diet-Induced Obese Mice Regulates Activation of NOD-Like Receptor Protein 3 Inflammasome. Front Cell Dev Biol. 2021 Nov 3;9:738731. (IF_{2023}: 6,081; punkty $MNiSW_{2023}$: 100).

Praca w trakcie procesu recenzowania:

Adamowski M, Sharma Y, Molcan T, Wołodko K, Kelsey G, Galvão AM. Ovarian leptin signalling regulates NLRP3 inflammasome activation and macrophage infiltration in a cell specific manner. doi:10.21203/rs.3.rs-2864298/v1. PPR:PPR655968.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW 7
STRESZCZENIE 12
SUMMARY 15
1. WSTĘP 18
1.1. Regulacja apetytu 18
1.2. Tkanka tłuszczowa 21
1.2.1. Komórki układu odpornościowego w tkance tłuszczowej 22
1.2.2. Funkcja endokrynna tkanki tłuszczowej 23
1.3. Szlak sygnałowy leptyny 24
1.4. Inflamasom NLRP3 26
1.4.1. Budowa inflamasomu NLRP3 26
1.4.2. Aktywacja inflamasomu NLRP3 27
1.5. Układ rozrodczy 30
1.5.1. Cykl płciowy u myszy 30
1.5.2. Regulacja hormonalna wzrostu pęcherzyków jajnika 32
1.5.3. Rola interleukiny-1β i interleukiny-18 w jajniku 36
1.5.3.1. Rola interleukiny-1β w jajniku 36
1.5.3.2. Rola interleukiny-18 w jajniku 37
1.5.4. Wpływ otyłości na funkcjonowanie jajnika 38
1.5.4.1. Rola leptyny w patogenezie dysfunkcji jajników podczas otyłości 39
1.6. Wpływ zaburzeń metabolizmu na aktywność inflamasomu NLRP3 41
2. HIPOTEZA I CELE BADAWCZE 43
3. MATERIAŁY I METODY 44
3.1 Zwierzęta 44
3.2. Schematy doświadczeń 44
3.2.1. Zadanie badawcze 1. Określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy 46
3.2.2. Zadanie badawcze 2. Określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy 46
3.2.3. Zadanie badawcze 3. Analiza transkryptomiczna komórek ziarnistych myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob* 47

3.2.4. Zadanie badawcze 4. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w komórkach wzgórka jajonośnego we wczesnej fazie otyłości 48
3.2.5. Zadanie badawcze 5. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy 49
3.3. Izolacja komórek ziarnistych z jajników myszy 49
3.4. Metody analityczne 50
3.4.1. Izolacja białka z jajników do przeprowadzenia testu immunoenzymatycznego .. 50
3.4.2. Izolacja białka z wątroby do przeprowadzenia testu immunoenzymatycznego ... 50
3.4.3. Immunoenzymatyczna analiza stężenia IL-1β 51
3.4.4. Metody biologii molekularnej 51
3.4.4.1. Izolacja mRNA i odwrotna transkrypcja 51
3.4.4.2. Real-time PCR 53
3.4.4.3. Przygotowanie biblioteki do RNA-seq 55
3.4.4.4. Analiza Western blotting 56
3.4.4.4.1. Izolacja i pomiar stężenia białek 56
3.4.4.4.2. Rozdział elektroforetyczny 56
3.4.4.4.3. Transfer białek na membranę 57
3.4.4.4.4. Inkubacja z przeciwciałami i detekcja białek 57
3.4.5. Metody histologiczne 58
3.4.5.1. Przygotowanie preparatów histologicznych 58
3.4.5.2. Barwienie immunohistochemiczne 58
3.4.5.3. Barwienie immunofluorescencyjne 59
3.4.6. Określenie fazy cyklu płciowego myszy 60
3.4.7. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego 61
3.5. Analiza bioinformatyczna 61
3.5.1. Analiza genów ulegających zróżnicowanej ekspresji 61
3.5.2. Analiza funkcjonalna 62
3.6. Analiza statystyczna wyników 63
4. WYNIKI 65
4.1. Zadanie badawcze 1. Określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy 65
4.2 Zadanie badawcze 2. Określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy 70

4.3. Zadanie badawcze 3. Analiza transkryptomiczna komórek ziarnistych myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob* 76
4.4. Zadanie badawcze 4. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w komórkach wzgórka jajonośnego we wczesnej fazie otyłości 88
4.5. Zadanie badawcze 5. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy 92
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA 96
5.1. Określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy 96
5.2. Określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy 97
5.3. Analiza transkryptomiczna komórek ziarnistych myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob* . 99
5.4. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w komórkach wzgórka jajonośnego we wczesnej fazie otyłości 101
5.5. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy 102
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI 104
7. LITERATURA 106
8. SUPLEMENTY 127

WYKAZ SKRÓTÓW

3β-HSD - dehydrogenaza 3β-hydroksysteroidowa (ang. 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase),

acetyl-CoA - acetylokoenzym A (ang. acetyl coenzyme A),

ADAMTS9 - agrekan 9 (ang. A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9),

AEBP2 - (ang. Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2),

AgRP - białko związane z Agouti (ang. agouti-related peptide),

AKR1C13 - aldo-keto reduktaza 1C13 (ang. aldo-keto reductase family 1, member C13),

ALPK3 - (ang. Alpha-protein kinase 3),

ANGPTL2 - angiopoetyna 2 (ang. angio-poetin like protein 2),

ARF1 - (ang. ADP Ribosylation Factor 1),

ASC - (ang. apoptosis-associated speck-like protein),

ATP - adenozynotrifosforan,

AUTS2 - (ang. autism susceptibility candidate 2),

BAT - brunatna tkanka tłuszczowa (ang. brown adipose tissue),

BCA - kwas bicynchoninowy,

BMI - wskaźnik masy ciała (ang. body mass index),

BP - proces biologiczny (ang. Biological Process),

BSA - albumina surowicy bydlęcej (ang. Bovine Serum Albumin),

CARD - domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (ang. Caspase Activation and Recruitment Domain),

CART - układ regulowany kokainą i amfetaminą (ang. cocaine and amphetamine-regulated transcript),

CASP1 - kaspaza 1 (ang. caspase 1),

CC - lokalizacja komórkowa produktu genu (ang. Cellular Component - CC),

CCK – cholecystokinina (ang. cholecystokinin),

CCL15 - (ang. C-C Motif Chemokine Ligand 15),

CXCL8 - (ang. C-X-C Motif Chemokine Ligand 8),

CCs - komórki wzgórka jajonośnego (ang. cumulus cells),

CD - dieta standardowa (ang. chow diet),

CD136 - receptor białka stymulującego makrofagi,

CD206 - receptor mannozowy,

cDNA - komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy (ang. complementary DNA),

CL - ciałko żółte (ang. corpus luteum),

CLIC - wewnątrzkomórkowe kanały chlorkowe (ang. chloride channel proteins),

COCs - komórki wzgórka jajonośnego (ang. cumulus-oocyte complex),

COL11A1 - kolagen typu 11 alfa 1 (ang. collagen, type XI, alpha 1),

CRP - białko C-reaktywne (ang. C-reactive protein),

Cy3 – indokarbocyjanina,

CYB5R3 – reduktaza 3 cytochromu b5 (ang. cytochrome b5 reductase 3),

DAMPs - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem tkanki (ang. damage-associated molecular pattern molecules),

DAPI - 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (ang. 4 ′, 6-diamidino-2-phenylindole),

DEGs - geny ulegające zróżnicowanej ekspresji (ang. Differentially Expressed Genes),

DGAT2 - acylotransferaza diacyloglicerolu 2 (ang. diacylglycerol O-acyltransferase 2),

DHEA – dihydroepiandrosteron,

DIO - otyłość indukowana dietą (ang. diet-induced obesity),

dNTP - trifosforan dezoksyrybonukleotydu,

E_2 - 17β-estradiol,

eCG - końska gonadotropina kosmówkowa (ang. equine chorionic gonadotropin),

ECM - macierz pozakomórkowa (ang. extracellular matrix),

EMCV - wirus grypy i wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (ang. encephalomyocarditis virus),

ELISA - test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay),

ERK - kinazę regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. extracellular signal-regulated kinase),

FA - kwasy tłuszczowe (ang. fatty acids),

FBP1 - fruktozo-1,6-bisfosfataza (ang. fructose bisphosphatase 1),

FC - krotność zmiany (ang. fold change),

FM – masa tkanki tłuszczowej (ang. fat mass),

FSH - hormon folikulotropowy (ang. follicle-stimulating hormone),

GAPDH - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego,

GCs - komórki ziarniste (ang. granulosa cells),

GDI1 - (ang. GDP Dissociation Inhibitor 1),

GLP-1 - peptyd glukagonopodobny-1 (ang. glucagon-like peptide 1),

GnRH - gonadoliberyna (ang. Gonadotropin-releasing hormone),

GO – kategorie GO (ang. Gene Ontology),

GSDMD - gazdermina D (ang. Gasdermin D),

hCG - ludzka gonadtropina kosmówkowa (ang. human chorionic gonadotropin),

HFD - dieta wysokotłuszczowa (ang. high fat diet),

IF – immunofluorescencja (ang. Immunofluorescence),

IGF - insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. insulin-like growth factor),

IHC – immunohistochemia (ang. Immunohistochemistry),

IL-18 – interleukina 18,

IL-18-BP - białko rozpuszczalne IL-18BP (ang. IL-18 binding protein),

IL-1R - receptor interleukiny-1,

IL-1β - interleukina 1β,

iNOS - syntaza tlenku azotu (ang. inducible nitric oxide synthase),

IκBα – inhibitor jądrowego czynnika κB,

JAK2 - kinaza tyrozynowa Janus-2 (ang. tyrosine kinase janus kinase 2),

KDM6B - demetylaza lizynowa 6b (ang. Lysine demethylase 6B),

LAMP1 - białko błonowe typu I związane z lizosomami (ang. lysosomal-associated membrane protein 1),

LepR - receptor leptyny (ang. leptin receptor),

LH - hormon luteinizujący (ang. luteinizing hormone),

LM – masa beztłuszczowa (ang. lean mass),

LPS – lipopolisacharyd bakteryjny,

LRR - powtórzenia bogate w leucynę (ang. Leucine-Rich Repeat),

M1 - klasycznie aktywowane makrofagi,

M2 - spolaryzowane alternatywnie makrofagi,

MAPK - kinaza aktywowana mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase),

MAVS - mitochondrialne przeciwwirusowe białko sygnałowe (ang. mitochondrial antiviral signaling protein),

MC4R - receptor melanokortyny typu 4 (ang. Melanocortin 4 receptor),

MF - funkcja produktu genu (ang. Molecular Function),

NAFLD - niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby (ang. nonalcoholic fatty liver disease),

NEK7 - (ang. NIMA-related kinase 7),

NF-κB - jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (ang. Nuclear Factor κB),

NLRP3 - (ang. Nod-like receptor protein 3),

NLRs - receptory NOD-podobne (ang. NOD-like receptors),

NMR - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. nuclear magnetic rezonance),

NPY - neuropeptyd Y (ang. neuropeptide Y),

P_4 – progesteron,

PAMPs - wzorce molekularne związane z patogenami (ang. pathogen associated molecular pattern),

Panx1 - paneksyna 1 (ang. pannexin 1),

PAT - różowa tkanka tłuszczowa (ang. pink adipose tissue),

PBS – buforowany roztwór soli fizjologicznej,

PBST – PBS z dodatkiem 0.1% Tween 20,

PCA - analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis),

PCOS - zespół policystycznych jajników (ang. Polycystic Ovary Syndrome),

PDGFRB - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu β (ang. platelet derived growth factor receptor beta),

PGE – prostaglandyna E,

PGF2α – prostaglandyna F2α,

PI3K - 3-kinaza fosfatydyloinozytolowa (ang. phosphatidylinositol 3-kinase),

POMC - proopiomelanokortyna (ang. proopiomelanocortin),

PPARγ, δ- receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów γ i δ (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ,),

PRR - receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptors),

PTEN - (ang. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten),

PTP - pory przejściowej przepuszczalności (ang. permeability transition pore),

PTP1B - białkowa fosfataza tyrozynowa 1B (ang. protein tyrosine phosphatase 1B),

PTPN1 - fosfataza tyrozynowa N1 (ang. protein tyrosine phosphatase N1),

PVDF - fluorek poliwinylidenu (ang. polyvinylidene fluoride),

PYD - domena pyriny (ang. pyrin domain),

PYY - peptyd PYY (ang. peptide YY),

RBP4 - białko wiążące retinol typu 4 (ang. retinol-binding protein 4),

RNA-seq - sekwencjonowanie RNA,

ROS - wolne rodniki tlenowe (ang. reactive oxygen species),

RPL37 - rybosomalne białko 37 (ang. Ribosomal Protein L37),

SCAP - (ang. SREBP cleavage- activating protein),

SEM - standardowy błąd średniej (ang. standard error of the mean),

SERP1 - Serpina 1 (ang. serpin family A member 1),

SH2 – domena wiążąca SH2 (ang. Src Homology 2 domain),

SHP2 - fosfataza tyrozynowa SH2 (ang. SH2-containing tyrosine phosphatase),

SLC22A15 - (ang. solute carrier family 22, member 15),

SOCS3 - supresor cytokiny sygnałowej 3 (ang. suppressor of cytokine signalling 3),

SREBP2 - (ang. sterol regulatory element- binding protein 2),

StAR - (ang. steroidogenic acute regulatory protein),

STAT3 - białko przenoszące sygnał i aktywujące transkrypcję 3 (ang. signal transducer and activator of transcription),

TCs - komórki osłonki (ang. theca cells),

TG – triglicerydy (ang. triglycerides),

TGF-β - transformujący czynnik wzrostu (ang. transforming growth factor β),

TLR - receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors),

TM9SF2 - (ang. Transmembrane 9 superfamily member 2),

TMB - 3,3′,5,5′-tetrametylbenzydyna,

TNF-α - czynnik martwicy nowotworu - α (ang. Tumor necrosis factor),

TRPC4AP - (ang. Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 4 Associated Protein),

USP42 - (ang. Ubiquitin specific peptidase 42),

VLDL - lipoproteiny niskiej gęstości (ang. very low-density lipoprotein),

WAT - biała tkanka tłuszczowa (ang. white adipose tissue),

Ym1, Ym2 - białka podobne do chitynaz,

ZC3H11A - (ang. Zinc Finger CCCH-Type Containing 11A),

α-MSH - hormon α-melanotropowy (ang. α-melanocyte stimulating hormone).

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.

SUMMARY

The role of leptin signalling pathway on NLRP3 inflammasome genes and proteins expression changes in the ovary of obese mice.

Obesity results from a disproportion between calorie intake and energy expenditure. The growth of white adipose tissue during obesity leads to an increase in leptin secretion, which regulates ovarian function controlling steroidogenesis, folliculogenesis or corpus luteum development. Obesity is associated with increased inflammation in the ovaries, anovulation, and decreased oocyte quality. Furthermore, maternal obesity is also associated with impaired embryo development or increased risk of fetal death. Thus, a better understanding of the pathogenesis of inflammation in the ovary may unravel the mechanisms underlying ovarian failure and infertility during the development of obesity. One of the factors involved in the maturation of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1β) and IL-18 is NLRP3 (NOD-like receptor protein 3) inflammasome, whose role in the ovary is poorly understood. Moreover, recent studies showed the establishment of leptin resistance in the ovaries of obese mice. Thus, the following hypothesis was set: leptin signalling pathway mediates regulation of the NLRP3 inflammasome in the ovary of obese mice. The aim of the present study was to characterise the expression of the NLRP3 inflammasome components at the mRNA and protein level in the ovaries of obese mice, particularly instigating the crosstalk with leptin signalling.

The following models were used in the experiments: model DIO: C57BL/6J (B6) mice fed for 4 weeks with a standard diet (CD, 4wkCD) or a high fat diet (HFD, 4wkHFD) and 16wkCD or 16wkHFD; model of genetic obesity: leptin receptor knockout mice (*db/db*) and a group of control mice (*db/+*); leptin knockout mice (*ob/ob*) and a group of control mice (*ob/+*); model of pharmacological hiperleptinemia: B6 mice treated intraperitoneally with 100 μg of leptin for 16 days (16L) or saline (16K). In order to characterize the profile of NLRP3 inflammasome activation throughout cyclicity, the expression of inflammasome NLRP3 components was determined in the ovaries of mice in either the *oestrus* and *diestrus* stages. Increased protein expression of NLRP3 and IL-18 in the ovaries of mice in *diestrus* stage was observed. In addition, NLRP3 immunolocalization was confirmed in granulosa cells (GCs), theca cells (TCs) and oocytes. Next, the crosstalk between leptin signaling pathway and the activation of NLRP3 inflammasome in the ovaries of obese mice was instigated using mouse

models of DIO, genetic obesity and pharmacological hyperleptinemia. In the DIO mice, the protein expression of NLRP3 inflammasome components (NLRP3, IL-18 p24) was increased in the 4wkHFD group, but decreased in the 16wkHFD group. In *db/db* mice, no differences in the expression of NLRP3 inflammasome components were found, except for the decreased mRNA of *Il-1β*. Moreover, in *ob/ob* mice, the protein expression of NLRP3 and IL-1β concentration was significantly reduced. This observation contrasted with findings in the hyperleptinemic mouse, in which we found increased mRNA and protein expression of NLRP3 inflammasome components and IL-1β concentration in the ovaries of 16L mice. In the next experiment, transcriptomic analysis of GCs collected from ovaries from *db/db* mice and *ob/ob* mice was performed. Despite the similarities in body weight in the obese homozygous mice (average body weight 40 grams while control *db/+* and *ob/+* mice around 20 grams), global gene expression profile was distinct between *db/db* and *ob/ob*, as well as, concerning specific genes involved in follicular development and ovulation. In the GCs of *db/db* mice, there was reduced expression of genes regulating steroidogenesis and related to prostaglandin action, while in the *ob/ob* mice increased expression of genes regulating steroidogenesis and lipid metabolism. Moreover, in the model of early phase of obesity (4wkHFD) and 16L the effect of leptin on the expression of NLRP3 inflammasome genes in cumulus cells (CCs) was determined. Transcriptomic analysis of the CCs of 4wkHFD and 16L mice showed common genes modulating the activity of the NLRP3 inflammasome. In addition, leptin increases the expression of NLRP3 inflammasome genes in the CCs of 16L mice. In the last experiment, the effect of leptin on the expression of genes and proteins of the NLRP3 inflammasome in the liver of obese mice partially contrasted with that in the ovary. Increased expression of NLRP3 inflammasome components at the protein level in the liver only after 16wkHFD mice was observed, whereas remained decreased in *ob/ob* mice corroborating the association with leptin signalling.

In conclusion, increased NLRP3 inflammasome activity was demonstrated in the ovaries of mice during *diestrus* stage. Confirmed localization of NLRP3 in the GCs, TCs and oocytes, suggests a potential role of NLRP3 inflammasome in follicles development and corpus luteum function. In addition, active leptin signaling pathway was shown to regulate the activity of the NLRP3 inflammasome in the ovaries of mice in early obesity. Conversely, after leptin resistance establishment in the ovaries of mice in late obesity, the activity of NLRP3 inflammasome was decreased. It shows that leptin

regulates NLRP3 inflammasome in the ovaries of obese mice. Transcriptomic analysis of the GCs of the *db/db* and *ob/ob* mice showed that disruption of the leptin signaling pathway altered the expression of genes crucial for mouse follicle development. Both strains of *db/db* and *ob/ob* mice have different pattern of leptin action and different responses. For instance non-canonical leptin action in *db/db* mice, which lacks leptin receptor, results in impaired steroidogenesis and prostaglandins activity, what may also impact on ovulation process and possibly involvement of NLRP3 inflammasome, while total lack of leptin in *ob/ob* mice additionally affect lipid metabolism that is crucial for oocyte development. It shows that dynamic changes of leptin signaling throughout obesity can differently affect ovarian function. Transcriptomic analysis of the CCs of 4wkHFD and 16L mice confirmed the presence of common genes regulating the activity of the NLRP3 inflammasome. Moreover, NLRP3 inflammasome activation in the mice ovaries in early obesity contrasted with its activation exclusively during late obesity in the liver. The obtained results suggest new avenues for treatment of infertility in obese females, particularly concerning assisted reproduction techniques in humans and animals.

1. WSTĘP

Najczęstszą przyczyną otyłości jest długotrwały brak równowagi pomiędzy nadmiarem spożywanych kalorii a zbyt powolnym ich spalaniem. Na globalny wzrost otyłości w społeczeństwie mają wpływ czynniki środowiskowe takie jak nadmierne spożywanie posiłków, dostępność do sieci fast food, a także siedzący tryb życia i multimedia (Albuquerque i in. 2017; Swinburn i in. 2011). W latach 1975-2016 wskaźnik masy ciała (ang. body mass index – BMI, masa-kg/wzrost-m^2) zwiększył się u 128,9 miliona dzieci, młodzieży i dorosłych, we wszystkich badanych krajach na całym świecie (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) 2017).

Otyłość prowadzi do wystąpienia stanu zapalnego jajników, czego efektem może być brak owulacji, obniżenie jakości oocytów, nieprawidłowy rozwój zarodka, czy też wyższe ryzyko śmierci płodu (Aune i in. 2014; Brewer & Balen 2010; Sermondade i in. 2019). W komórkach ziarnistych (ang. granulosa cells - GCs) otyłych kobiet wykazano m. in. uszkodzenie mitochondriów, stres retikulum endoplazmatycznego, a także zmiany w procesie steroidogenezy (Si i in. 2021). W oocytach otyłych matek wykazano m. in. stres oksydacyjny, apoptozę, zmiany epigenetyczne oraz skrócenie telomerów (Ge i in. 2021; Hou i in. 2016; Jungheim i in. 2010). Rozrost białej tkanki tłuszczowej podczas rozwoju otyłości skutkuje zwiększeniem produkcji leptyny, której główną funkcją jest regulacja ośrodka sytości w podwzgórzu oraz metabolizmu energetycznego (Considine i in. 1996; Maffei i in. 1995; Webber 2003). Natomiast w jajniku leptyna wpływa na takie procesy jak steroidogeneza, folikulogeneza czy też funkcjonowanie ciałka żółtego (ang. corpus luteum – CL) (Galvão i in. 2014; Lin i in. 2009; Wołodko i in. 2021). 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 – NLRP3), którego rola w jajniku jest słabo poznana. Dlatego też lepsze poznanie patogenezy powstania procesu zapalnego w jajniku przyczyni się do zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw niewydolności jajników i niepłodności w trakcie rozwoju otyłości.

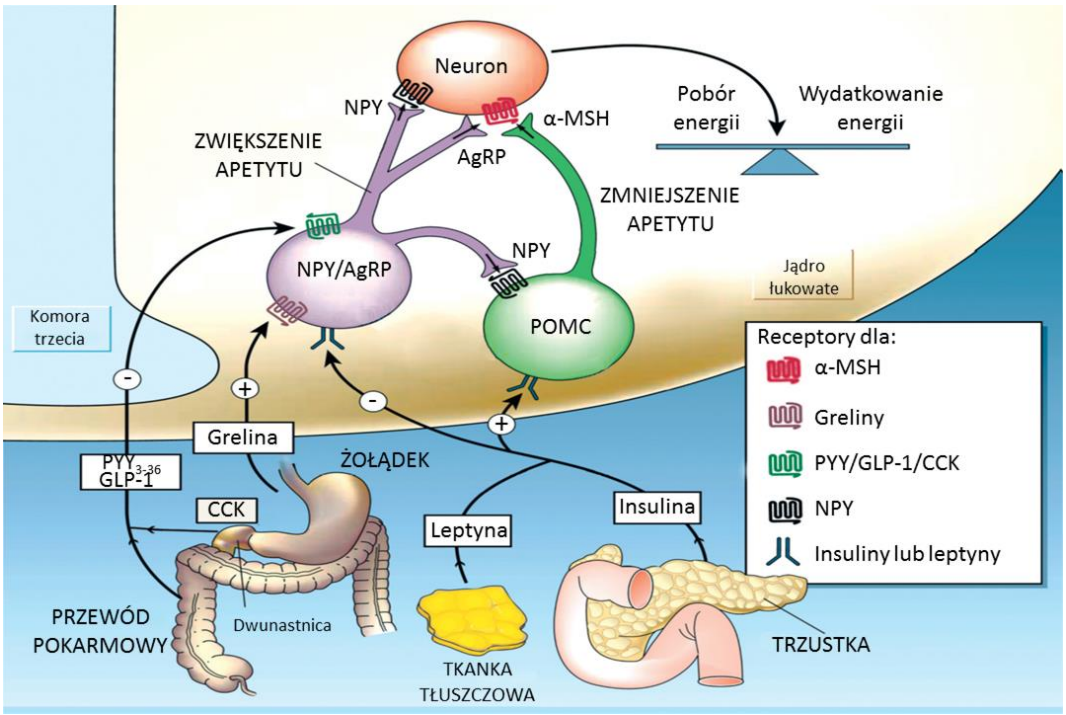
1.1. Regulacja apetytu

Głównym ośrodkiem w regulacji apetytu jest jądro łukowate podwzgórza zlokalizowane w pniu mózgu, w pobliżu komory trzeciej. Sygnały, które regulują pobór i wydatkowanie energii można podzielić na dwie kategorie. Pierwsza kategoria dotyczy

powstających podczas spożywania posiłku sygnałów krótkoterminowych, informujących o osiągnięciu stanu sytości. Jednym z pierwszych hormonów sytości jest cholecystokinina, która jest wydzielana przez dwunastnicę w odpowiedzi na częściowo strawione tłuszcze oraz nadtrawione białka (Gibbs i in. 1973). Hormon ten aktywując receptory lokalnie występujące na dwunastnicy, wysyła sygnał za pośrednictwem nerwu błędnego do mózgu, czego efektem jest odczuwanie uczucia sytości. Druga kategoria dotyczy sygnałów długoterminowych, do których należą hormony takie jak insulina, grelina i leptyna, które są uwalniane proporcjonalnie do ilości glukozy i tłuszczu w organizmie, a następnie wchłaniane do ośrodkowego układu nerwowego, proporcjonalnie do ich stężenia w osoczu (Bagdade i in. 1967; Considine i in. 1995; Schwartz i in. 2000; Woods & D'Alessio 2008). Bezpośrednio przed zjedzeniem posiłku (kiedy żołądek jest pusty) poziom greliny znacznie wzrasta, a następnie spada równie szybko po jedzeniu (Cummings i in. 2001). Jądro łukowate podwzgórza posiada w swojej strukturze dwa typy neuronów, działających antagonistycznie, które stymulują (układ oreksygeniczny) bądź hamują (układ anoreksygeniczny) łaknienie (Rys. 1). Neurony stymulujące przyjmowanie pokarmu i zmniejszające wydatkowanie energii produkują neuropeptyd Y (ang. neuropeptide Y – NPY) oraz białko związane z Agouti (ang. agouti-related peptide – AgRP) (Hahn i in. 1998; Stanley i in. 1986). Neurony hamujące przyjmowanie pokarmu i zwiększające wydatkowanie energii wykazują ekspresję pochodnej proopiomelanokortyny (ang. proopiomelanocortin – POMC), które wytwarzają hormon α-melanotropowy (ang. α-melanocyte-stimulating hormone - α-MSH) oraz układ regulowany kokainą i amfetaminą (ang. cocaine and amphetamine-regulated transcript – CART) (Adam i in. 2002; Fan i in. 1997). Zazwyczaj, gdy jeden typ neuronów jest aktywowany, drugi jest blokowany. Neurony NPY, dzięki produkcji AgRP, blokują receptor melanokortyny (Hahn i in. 1998). Aktywowane podczas odchudzania neurony NPY/AgRP zwiększają pobór energii w dwojaki sposób: przez zwiększenie uwalniania NPY oraz hamowanie apetytu przez blokowanie receptorów α-MSH (Sahu i in. 1988; Schwartz i in. 1997). Leptyna i insulina zmniejszają łaknienie przez hamowanie neuronów NPY/AgRP oraz stymulują w tym samym czasie neurony POMC i uwalnianie α-MSH. Grelina uwalniana z żołądka stymuluje łaknienie poprzez aktywowanie neuronów NPY/AgRP, z kolei uwalniane w jelicie cienkim peptyd PYY_{3-36} (ang. peptide YY – PYY) oraz peptyd glukagonopodobny-1 (ang. glucagon-like peptide 1 – GLP-1) hamuje te neurony, powodując zmniejszenie apetytu (Batterham i in. 2002; Schwartz & Morton 2002; Seo i in. 2008). Zintegrowany sygnał o charakterze

stymulującym bądź hamującym łaknienie dociera do innych części podwzgórza, który następnie trafia drogą wstępującą do kory mózgowej, hipokampu, wzgórza i dalej kierowany jest drogą zstępującą do rdzenia kręgowego (Berthoud 2002).

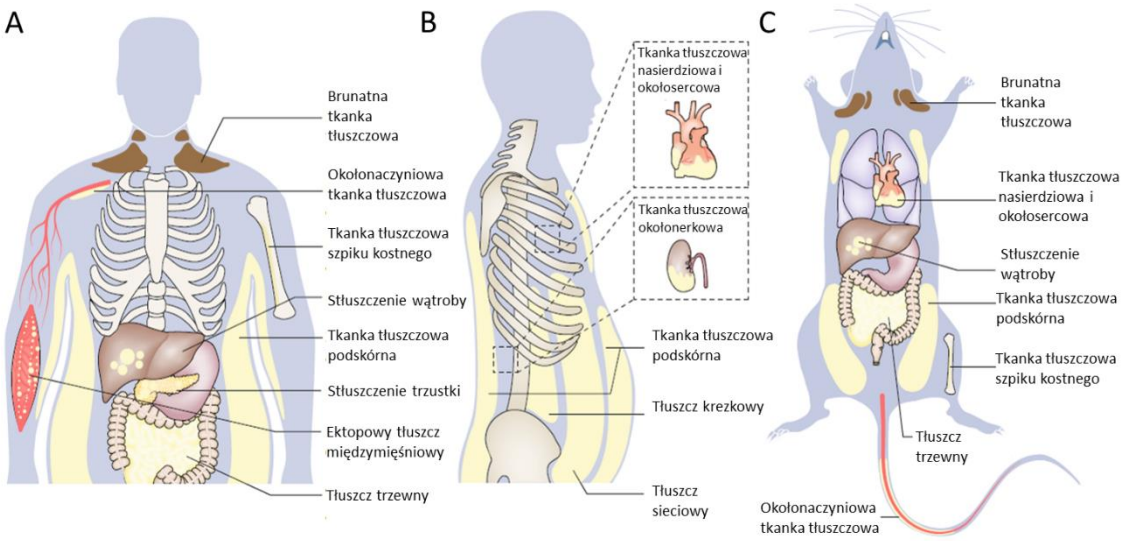
Wiele znanych monogenicznych i niektórych poligenicznych przyczyn otyłości jest związanych ze zmianami w szlaku melanokortyny. Mutacja w genie kodującym receptor melanokortyny typu 4 (ang. Melanocortin 4 receptor - MC4R), odgrywającym znaczną rolę w regulacji pobierania pokarmu oraz homeostazy energetycznej, powoduje otyłość ekstremalną u około 5% dzieci (Farooqi i in. 2003). Z kolei mutacja POMC wiąże się z ciężką postacią otyłości połączoną z charakterystyczną pigmentacją rudych włosów u osób dotkniętych tą chorobą (Krude i in. 1998). Co ciekawe, u 12% psów rasy Labrador retriever występuje mutacja genu POMC, powodująca zaburzenia produkcji β-melanotropiny i β-endorfin zaangażowanych w homeostazę energetyczną, przyczyniając się do zwiększonego łaknienia oraz wzrostu masy ciała tych zwierząt (Raffan i in. 2016). U ludzi otyłość umiarkowana lub olbrzymia może być bezpośrednio związana z mutacją w genie leptyny oraz receptora leptyny (Clément i in. 1998; Fischer-Posovszky i in. 2010).



Rys. 1. Schemat regulacji apetytu. Skróty: AgRP - białko z rodziny agouti, CCK – cholecystokinina, GLP-1 - peptyd glukagonopodobny-1, α-MSH – hormon α-melanotropowy, NPY – neuropeptyd Y, POMC – proopiomelanokortyna, PYY – peptyd YY (wg Schwartz & Morton 2002 zmodyfikowany).

1.2. Tkanka tłuszczowa

Wyróżniamy trzy rodzaje tkanki tłuszczowej – białą tkankę tłuszczową (ang. white adipose tissue – WAT), brunatną tkankę tłuszczową (ang. brown adipose tissue – BAT) oraz różową tkankę tłuszczową (ang. pink adipose tissue – PAT). Tkanka tłuszczowa biała jest rozmieszczona w różnych miejscach w organizmie i można wyróżnić dwa główne jej rodzaje: podskórną oraz trzewną (Rys. 2). Tkanka tłuszczowa trzewna otacza wewnętrzne organy w jamie brzusznej oraz śródpiersiu, podczas gdy tkanka tłuszczowa podskórna tworzy warstwę tłuszczu pod skórą. Brunatna tkanka tłuszczowa występuje głównie w obszarze nadobojczykowym i szyi (Quail & Dannenberg 2019). Rozmieszczenie białej i brunatnej tkanki tłuszczowej w organizmie ludzi i myszy przedstawiono na rys. 2.



Rys.2. Rozmieszczenie tkanki tłuszczowej u ludzi i myszy. A) Rozmieszczenie tkanki tłuszczowej u ludzi – widok z przodu; B) Rozmieszczenie tkanki tłuszczowej u ludzi – widok z boku; C) Rozmieszczenie tkanki tłuszczowej u myszy – widok od strony brzusznej (wg Quail & Dannenberg 2019, zmodyfikowany).

Białe adipocyty będące dominującymi komórkami w WAT, są magazynem substancji zapasowych. Krople tłuszczowe wewnątrz tych komórek wypełniają około 90% ich objętości, jądro komórkowe znajduje się na obrzeżach komórki, cytoplazma tworzy cienką obwódkę, a mitochondria są słabo rozwinięte. Brunatne adipocyty BAT odpowiadają za wytwarzanie ciepła. Cechą charakterystyczną tych komórek jest występowanie kilku kropli tłuszczowych, liczne i duże mitochondria z dobrze rozwiniętymi grzebieniami. Różowe adipocyty powstające z podskórnej tkanki tłuszczowej u kobiet odpowiadają za produkcję mleka (Giordano i in. 2014). Poza wyżej wymienionymi istnieją także adipocyty beżowe, stanowiące formę pośrednią między adipocytami białymi i brunatnymi (Wu i in. 2012).

1.2.1. Komórki układu odpornościowego w tkance tłuszczowej

W zdrowej tkance tłuszczowej możemy znaleźć wiele komórek układu odpornościowego: makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki tuczne, eozynofile, neutrofile oraz limfocyty. Rozrost tkanki tłuszczowej zapoczątkowuje przewlekły stan zapalny, któremu towarzyszy infiltracja komórek odpornościowych. Makrofagi stanowią najliczniejszą populację komórek immunologicznych w tkance tłuszczowej (Mraz & Haluzik 2014). Drugą najliczniejszą populacją komórek tkanki tłuszczowej są limfocyty T (Mraz & Haluzik 2014). Rozrost tkanki tłuszczowej prowadzi do infiltracji do tkanki m. in. komórek tucznych (Liu i in. 2009; Wu i in. 2007). Co więcej u myszy już po 3 tygodniach (tyg.) od momentu rozpoczęcia stosowania diety wysokotłuszczowej (ang. high fat diet - HFD) liczba limfocytów B w tkance tłuszczowej zwiększyła się (Duffaut i in. 2009). U myszy karmionych HFD zaobserwowano zwiększony napływ limfocytów T CD8+ z krwi do tkanki tłuszczowej przed napływem makrofagów (Nishimura i in. 2009). Analogicznie u myszy karmionych HFD obserwowano napływ komórek dendrytycznych do tkanki tłuszczowej oraz wątroby przed napływem makrofagów (Stefanovic-Racic i in. 2012). Powyższe wyniki badań wskazują, że rozrostowi tkanki tłuszczowej towarzyszy napływ z krwi obwodowej wielu rodzajów komórek, w tym makrofagów będących najliczniejszą populacją komórek immunologicznych.

Makrofagi można podzielić na dwie odrębne fenotypowo subpopulacje komórek. Klasycznie aktywowane makrofagi (M1) wykazują charakter prozapalny, natomiast spolaryzowane alternatywnie makrofagi (M2) przeciwzapalny (Cai i in. 2022). Fenotyp M1 charakteryzuje się zwiększoną ekspresją białek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (ang. major histocompatibility complex) i białek powierzchniowych CD80 i CD86. Ponadto cechuje je zwiększona aktywność indukowalnej syntazy tlenku azotu (ang. inducible nitric oxide synthase - iNOS) oraz uwalnianie cytokin prozapalnych (IL-1β, IL-6, IL-12 i IL-18), czynnika martwicy nowotworu - α (ang. Tumor necrosis factor - TNF-α) oraz wielu chemokin np. CCL15 (ang. C-C Motif Chemokine Ligand 15), CCL20, CXCL8 (ang. C-X-C Motif Chemokine Ligand 8) (Brandys & Chadzińska 2021). Fenotyp M2 charakteryzuje się zwiększoną ekspresją arginazy 1 (ang. arginase 1), receptora IL-4, białka Fizz1 (ang. found in inflammatory zone 1), receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów γ i δ (ang. peroxisome proliferator-activated receptor γ, δ - PPAR γ, δ), białek podobnych do chitynaz (Ym1, Ym2),

receptora mannozowego (CD206) i receptor białka stymulującego makrofagi (CD136). Ponadto makrofagi M2 cechuje zwiększone uwalnianie transformującego czynnika wzrostu (ang. transforming growth factor β - TGF-β) oraz IL-10. W obrębie tej grupy komórek można wyróżnić kilka subpopulacji w zależności od czynnika wywołującego polaryzację: M2a (stymulacja: IL-4, IL-13), M2b (stymulacja: IL-1β, lipopolisacharyd (LPS) + kompleksy immunologiczne), M2c (stymulacja: IL-10, TGF-β, glikokortykoidy) i M2d (mikrośrodowisko nowotworu) (Brandys & Chadzińska 2021). Co ciekawe w tkance tłuszczowej osób otyłych obserwuje się zwiększoną liczbę makrofagów M1 (Lumeng i in. 2007). Ze względu na dużą plastyczność fenotypową makrofagów, mogą one różnicować się w formy zbliżone do fenotypu makrofagów M1 i M2. Ostatnie badania z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania RNA umożliwiły identyfikację nowych populacji makrofagów, w tym takich które są związane z otyłością (Hill i in. 2018; Jaitin i in. 2019). Poznanie fenotypu makrofagów obecnych w tkance pozwala lepiej zrozumieć ich rolę, a także możliwe konsekwencje ich nadmiernej aktywności.

1.2.2. Funkcja endokrynna tkanki tłuszczowej

Otyłości towarzyszy rozrost tkanki tłuszczowej, która nie tylko magazynuje energię, ale również pełni funkcję aktywnego organu endokrynnego magazynującego hormony steroidowe, a także czynnie uwalniającego wiele substancji bioaktywnych, zwanych adipokinami. Do adipokin zaliczamy m.in. adiponektynę, rezystynę, białko wiążące retinol typu 4 (ang. retinol-binding protein 4 - RBP4), lipokainę 2, białko podobne do angiopoetyny 2 (ang. angio-poetin like protein 2 - ANGPTL2) czy wisfatynę (Góralska i in. 2015). Jednym z pierwszych przełomowych odkryć wskazujących na wydzielniczą aktywność tkanki tłuszczowej było wykazanie zwiększonej ekspresji TNF-α na poziomie mRNA i białka w modelach otyłości i cukrzycy u gryzoni (Hotamisligil i in. 1993).

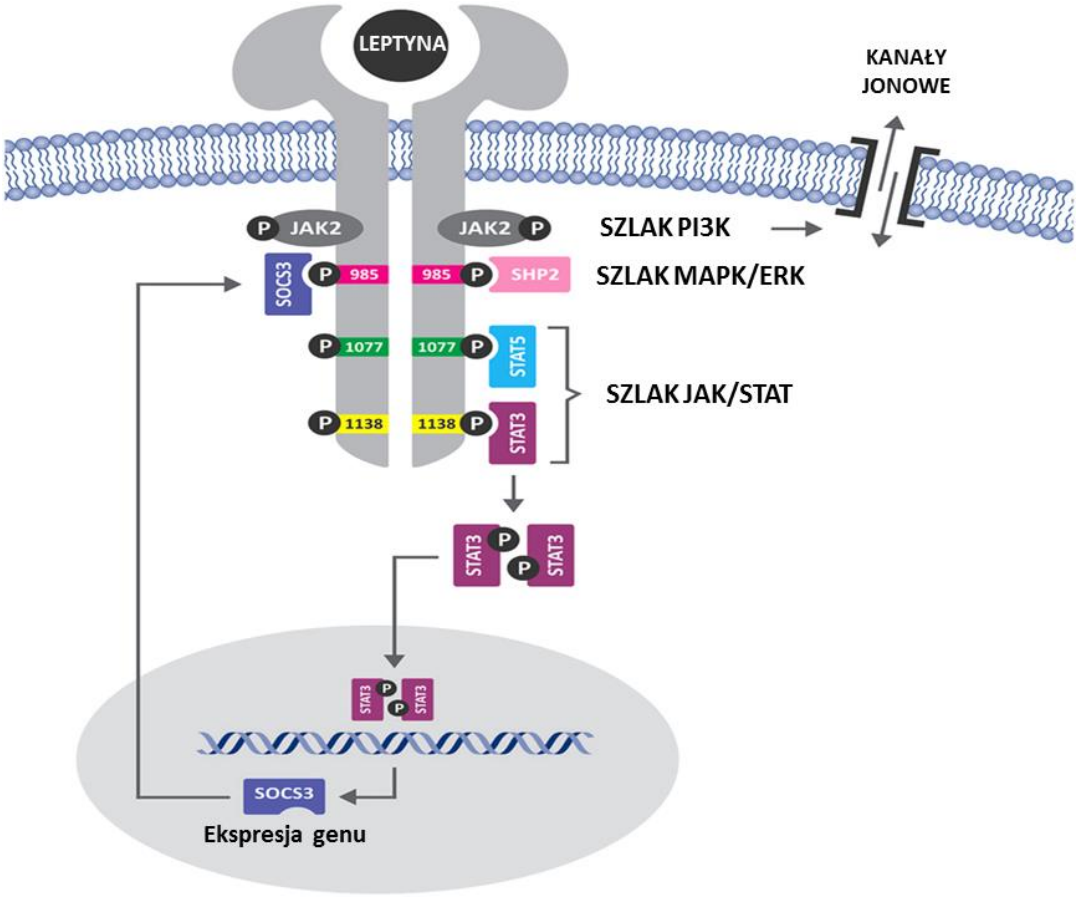
Badania przeprowadzone przez grupę Friedmana zrewolucjonizowały pogląd na temat otyłości poprzez odkrycie pierwszej adipokiny – leptyny (Zhang i in. 1994). Hormon ten oprócz tkanki tłuszczowej jest uwalniany w takich narządach jak serce, wątroba, jelita, prostata czy jajniki, a także w mniejszym stężeniu w płucach i nerkach (Margetic i in. 2002; Zhang i in. 1994). Główną funkcją leptyny, jest regulacja ośrodka sytości w podwzgórzu oraz metabolizmu energetycznego (Considine i in. 1996; Maffei i in. 1995; Webber 2003). Leptyna oprócz udziału w regulacji ośrodka sytości

w podwzgórzu i metabolizmu energetycznego, pełni istotne funkcje wielu innych procesach takich jak angiogeneza, hematopoeza, odpowiedzi zapalnej, a także reguluje funkcjonowanie układu rozrodczego poprzez oddziaływanie na oś podwzgórze-przysadka-gonady (Fantuzzi & Faggioni 2000; Salem 2021). Powyższe wskazuje na istotną rolę tkanki tłuszczowej jako organu endokrynnego, który syntetyzuje wiele czynników mogących oddziaływać na inne narządy.

1.3. Szlak sygnałowy leptyny

Leptyna wiąże się ze specyficznymi receptora zlokalizowanymi na błonie komórkowej. Receptory leptyny (ang. leptin receptor – LepR) należą do receptorów cytokin klasy 1, które nie posiadają aktywności enzymatycznej. Wyróżniamy 6 izoform receptorów leptyny (LepRa-LepRf), które różnią się długością domeny wewnątrzkomórkowej (Ahima & Flier 2000). Izoforma LepRa transportuje leptynę z surowicy do mózgu (Elmquist i in. 1998; Hileman i in. 2002). Najważniejszą izoformą jest długa izoforma LepRb, która posiada wszystkie domeny wewnątrzkomórkowe wymagane do pełnej aktywacji szlaku sygnałowego leptyny w komórce (Tartaglia i in. 1995). Wiązanie leptyny do LepRb aktywuje kinazę tyrozynową Janus-2 (ang. tyrosine kinase janus kinase 2 – JAK2), która połączona z LepRb fosforyluje wysoce konserwatywne reszty tyrozynowe Y985, Y1077 i Y1138 (rys. 3). Ufosforylowane reszty tyrozynowe, stanowią miejsca łączenia dla cząsteczek sygnałowych, które posiadają domenę SH2 (ang. Src Homology 2 – SH2), wyznaczając aktywację specyficznych szlaków sygnałowych (Banks i in. 2000). Fosforylacji reszty tyrozynowej Y1138 towarzyszy przyłączenie białka przenoszącego sygnał i aktywującego transkrypcję 3 (ang. signal transducer and activator of transcription – STAT3), czynnika transkrypcyjnego pośredniczącego w głównym działaniu leptyny (Bates i in. 2003; Gao i in. 2004). Fosforylacja białka STAT3 prowadzi do utworzenia dimerów, które przemieszczają się do jądra komórkowego inicjując transkrypcję docelowych genów. Poza tym ufosforylowanie reszty tyrozynowej Y985 oddziałuje na fosfatazę tyrozynową SH2 (ang. SH2-containing tyrosine phosphatase - SHP2), która aktywuje kinazę aktywowaną mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase – MAPK) oraz kinazę regulowaną zewnątrzkomórkowo (ang. extracellular signal-regulated kinase – ERK) (Banks i in. 2000). Ufosforylowana reszta tyrozynowa Y985 wiąże także supresor cytokiny sygnałowej 3 (ang. suppressor of cytokine signalling 3 – SOCS3), odpowiedzialnej za hamowanie szlaku sygnałowego leptyny na zasadzie

sprzężenia zwrotnego, której transkrypcja zależy od fosforylacji STAT3 (Bjørbaek i in. 1999). Ponadto białkowa fosfataza tyrozynowa 1B (ang. protein tyrosine phosphatase 1B – PTP1B) reguluje szlak sygnałowy leptyny poprzez blokowanie transkrypcji genu kodującego SOCS3 oraz zmniejszenie stopnia ufosforylowania JAK2 (Zabolotny i in. 2002). Z kolei ufosforylowane reszty tyrozynowe Y1077 przyłączają STAT5, które pośredniczą we wpływie leptyny na homeostazę energetyczną (Tups 2009). Aktywowanie JAK2 przez leptynę prowadzi do aktywacji 3-kinazy fosfatydyloinozytolowej (ang. phosphatidylinositol 3-kinase – PI3K), która jest głównym szlakiem sygnałowym wykorzystywanym przez insulinę i insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. insulin-like growth factor − IGF) (Hekerman i in. 2005). Szlak JAK2/STAT reguluje głównie ekspresję genów, podczas gdy szlak JAK2/PI3K reguluje nie tylko ekspresję genów, ale także aktywność kanałów jonowych (Donato i in. 2010; Gavello i in. 2016). Leptynooporność obserwowana w trakcie zaawansowanej otyłości, upośledza działanie szlaku sygnałowego leptyny i tym samym obniża skuteczność jej leczenia (Izquierdo i in. 2019; Myers i in. 2012). Powodem tego jest niezdolność leptyny do dotarcia do komórek docelowych, ze względu na zmniejszoną ekspresję LepR lub dysfunkcję szlaku sygnałowego (Izquierdo i in. 2019; Myers i in. 2012). Prawdopodobnie istnieje wiele mechanizmów molekularnych i genetycznych, które mogą prowadzić do leptynooporności. Sposób w jaki te czynniki są ze sobą powiązane oraz jak zmiany w szlakach sygnałowych prowadzą do wystąpienia leptynooporności w dalszym ciągu jest niejasne.



Rys. 3. Szlak sygnałowy leptyny. Skróty: ERK- kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo, JAK2 - kinaza tyrozynowa Janusa 2, MAPK - kinaza aktywowana mitogenami, PI3K - 3-kinaza fosfatydyloinozytolowa, SHP2 – fosfataza posiadająca domenę SH2, SOCS3 – supresor cytokiny sygnałowej 3, STAT3 - białka przenoszące sygnał i aktywujące transkrypcję 3, STAT5 - białka przenoszące sygnał i aktywujące transkrypcję 5 (wg Andreoli i in. 2019, zmodyfikowany).

1.4. Inflamasom NLRP3

1.4.1. Budowa inflamasomu NLRP3

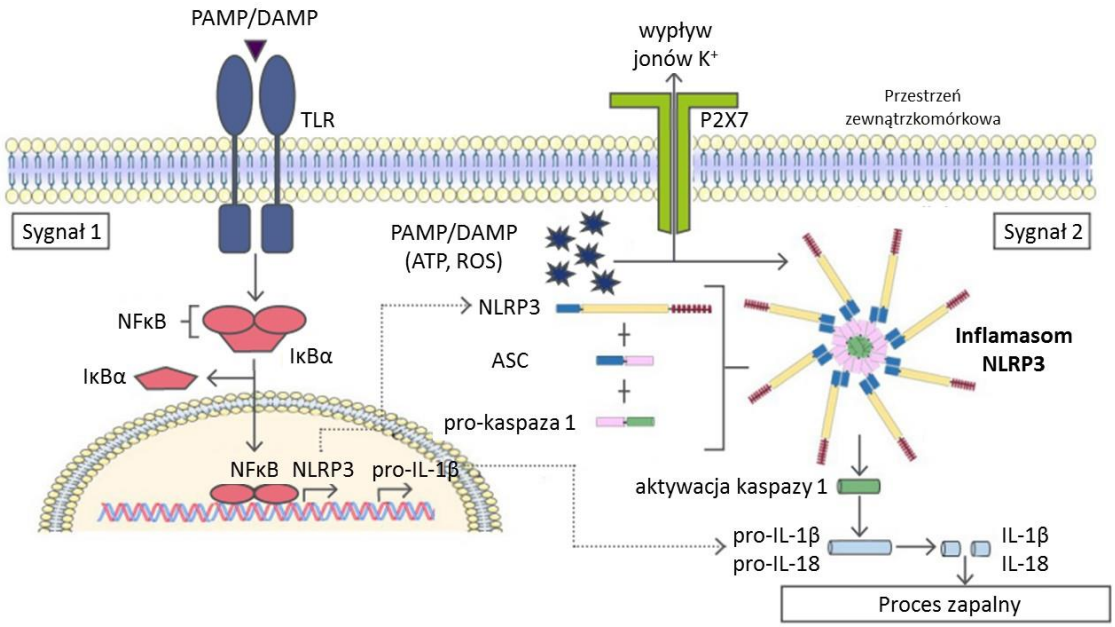
Inflamasomy są kompleksem białek cytozolowych, posiadających receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptors - PRR). Wśród receptorów NOD-podobnych (ang. NOD-like receptors - NLRs), inflamasom NLRP3 jest najlepiej scharakteryzowany. Współtworzy on kompleks białek odpowiedzialnych za przekształcenie dwóch cytokin prozapalnych do form aktywnych: IL-1β oraz IL-18 (Davis i in. 2011; De Nardo & Latz 2011; Martinon i in. 2002). Inflamasom NLRP3 pośredniczy w aktywowaniu mediatorów zapalnych, szczególnie istotnych w chorobach autoimmunizacyjnych, neurodegeneracyjnych, a także metabolicznych, w tym niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (ang. nonalcoholic fatty liver disease - NAFLD), cukrzycy typu 2, miażdżycy, nadciśnieniu tętniczym, otyłości (Mangan i in. 2018).

Inflamasom NLRP3 składa się z białka NLRP3, białka adaptorowego ASC (ang. apoptosis-associated speck-like protein - ASC) oraz białka efektorowego kaspazy 1 (ang. caspase 1 – CASP1) (Rys. 4). Białko NLRP3 składa się z 3 części, które zawierają N-końcową domenę pyriny (ang. pyrin domain – PYD), centralną domenę NACHT oraz C-końcową domenę LRR (ang. leucine-rich repeat - LRR). Domena NACHT ma aktywność ATP-azy, która jest istotna dla samoregulacji i funkcjonowania NLRP3, podczas gdy domena LRR związana jest z indukowaniem autoinhibicji (Duncan i in. 2007; Swanson i in. 2019). Białko ASC posiada 2 domeny wiążące białka, N-końcową PYD oraz C-końcową domenę aktywacji i rekrutacji kaspaz (ang. Caspase Activation and Recruitment Domain - CARD). Pro-kaspaza 1 (CASP1 p45) zbudowana jest z N-końcowej domeny CARD, środkowej dużej podjednostki katalitycznej (CASP1 p20) oraz C-końcowej mniejszej podjednostki katalitycznej (CASP1 p10). Po stymulacji, dochodzi do oligomeryzacji NRLP3 poprzez homotypowe (podobnie strukturalnie) wiązanie domen NACHT. Do zoligomeryzowanych cząsteczek NLRP3 rekrutowane są białka ASC, które za pośrednictwem domen PYD tworzą helikalny filament (Cai i in. 2014; Lu i in. 2014; Schmidt i in. 2016). Utworzona makrocząsteczka ASC poprzez interakcje CARD – CARD wiąże CASP1 p45 umożliwiając jej rozpad i aktywację. Ponadto w aktywacji inflamasomu NLRP3 kluczowym białkiem jest NEK7 (ang. NIMA-related kinase 7 – NEK7) (He i in. 2016b; Schmid-Burgk i in. 2016; Shi i in. 2014). Po aktywacji inflamasomu, NEK7 oligomeryzuje z NLRP3 w kompleks, który jest niezbędny dla utworzenia filamentów ASC i aktywacji CASP1 (He i in. 2016b; Shi i in. 2016).

1.4.2. Aktywacja inflamasomu NLRP3

Poza kilkoma wyjątkami, aktywacja inflamasomu odbywa się dwuetapowo. Najpierw dochodzi do uwrażliwienia komórki i późniejszej aktywacji inflamasomu. Pierwszym sygnałem w aktywacji inflamasomu NLRP3 jest sygnał inicjujący (ang. priming signal), indukowany przez związanie ligandów, takich jak lipopolisacharyd (LPS) przez receptory Toll-podobne (ang. Toll-like receptors - TLR) oraz aktywację szlaku jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB (ang. Nuclear Factor κB - NF-κB), czego efektem jest zwiększenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 (Rys. 4) (Bauernfeind i in. 2009). Modyfikacje potranslacyjne takie jak fosforylacja czy ubikwitynacja mogą grać kluczową rolę w aktywacji inflamasomu (Yang i in. 2019). Sygnał drugi obejmuje aktywowanie i proces tworzenia inflamasomu NLRP3 poprzez związanie ligandów

z wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (ang. pathogen associated molecular pattern – PAMPs) lub wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem tkanki (ang. damage-associated molecular pattern molecules – DAMPs). Ponadto glukoza, ceramidy, kwas moczowy czy LPS mogą powodować aktywację inflamasomu NLRP3 (Stienstra i in. 2012; Traba & Sack 2017). Alternatywnym sposobem aktywacji inflamasomu NLRP3 jest nieklasyczna ścieżka sygnałowa, wymagająca sygnału trzeciego, w którym pośredniczy kaspaza 4/5 u ludzi i kaspaza 11 u myszy (Shi i in. 2014). Bezpośrednie połączenie LPS z kaspazą skutkuje jej rozpadem i aktywacją. Kaspaza 4/5/11 indukuje pyroptozę przez przekształcenie gazderminy D (ang. Gasdermin D – GSDMD) oraz paneksyny 1 (ang. pannexin 1 - Panx1) zaangażowanych w tworzenie kanałów, poprzez które dochodzi do uwolnienia m.in. cytokin (Evavold i in. 2018; Kayagaki i in. 2015; Pelegrin & Surprenant 2006; Yang i in. 2015). Istnieje kilka mechanizmów molekularnych, dzięki którym dochodzi do utworzenia aktywnej formy inflamasomu. Uważa się, że aktywacja inflamasomu NLRP3 obejmuje wiele sygnałów, takich jak wypływ jonów potasu (K^+), jonów chlorkowych (Cl^-), przepływ jonów wapnia (Ca^{2+}), rozpad lizosomu, dysfunkcję aparatu Golgiego lub mitochondriów, zmiany metaboliczne, z których większość nie wyklucza się wzajemnie (Swanson i in. 2019).



Rys. 4. Przykładowy schemat aktywacji inflamasomu NLRP3 (ang. NOD-like receptor protein 3). Skróty: PAMP – wzorce molekularne związane z patogenami, DAMP – wzorce molekularne związane z uszkodzeniem tkanki, TLR – receptor Toll-podobny, NFκB – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB, IκBα – inhibitor jądrowego czynnika κB, ATP – adenozynotrifosforan, ROS – wolne rodniki tlenowe, P2X7 - receptor purynergiczny P2X7, NLRP3 – białko NLRP3, ASC – białko adaptorowe ASC, pro-IL-1β – prekursor interleukiny-1β, pro-IL-18 – prekursor interleukiny-18 (wg Kenealy & Creagh 2018, zmodyfikowany).

Wypływ jonów K^+ jest niezbędny do aktywacji inflamasomu NLRP3. Wykazano, że nigerycyna oraz adenozynotrifosforan (ATP) wiążący się z jonotropowym receptorem purynergicznym P2X7 powoduje obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu K^+ w mysich makrofagach, dzięki czemu dochodzi do przekształcenia IL-1β do formy aktywnej (Pelegrin & Surprenant 2006; Perregaux & Gabel 1994). W ostatnim czasie pojawiły się również doniesienia, w których zaproponowano, że do aktywacji inflammasomu NLRP3 może dojść bez konieczności wypływu jonów K^+ (Gaidt i in. 2016; Groß i in. 2016; Wolf i in. 2016). Podobnie jak w przypadku jonów K^+, niezbędnym elementem do aktywacji NLRP3 jest napływ jonów Ca^{2+} (Lee i in. 2012; Murakami i in. 2012). Adenozynotrifosforan mobilizuje jony Ca^{2+} przez aktywowanie powolnego napływu jonów Ca^{2+} przy udziale receptora P2X7, koordynując wypływ jonów K^+ (Di i in. 2018). Wypływ jonów K^+ aktywuje uwolnienie magazynów jonu Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej poprzez otwarcie kanałów Ca^{2+} (Murakami i in. 2012; Yaron i in. 2015). Należy jednak podkreślić, iż istnieją badania wskazujące, że w przypadku niektórych bodźców, napływ jonów Ca^{2+} nie jest konieczny do aktywacji inflamasomu NLRP3 (Katsnelson i in. 2015). Niskie stężenie jonów Cl^- w przestrzeni zewnątrzkomórkowej zwiększa sekrecję IL-1β przy udziale ATP. Nowsze dane wskazują na udział jonów K^+ w procesie oligomeryzacji inflamasomu NLRP3, a napływ jonów Cl^- w aktywowaniu polimeryzacji ASC podczas formowania inflamasomu NLRP3 (Green i in. 2018). Ponadto wykazano, że wewnątrzkomórkowe kanały chlorkowe 1 i 4 (ang. chloride intracellular channel – CLIC), indukują transkrypcję *Il-1β* oraz aktywują inflamasom NLRP3 (Domingo-Fernández i in. 2017). Choć rola aparatu Golgiego w aktywacji inflamasomu NLRP3 była długo kwestionowana, badania wskazują na jego istotną rolę. Inflamasom NLRP3 przemieszcza się z retikulum endoplasmatycznego do aparatu Golgiego w kompleksie z SREBP2 (ang. sterol regulatory element- binding protein 2 – SREBP2) oraz SCAP (ang. SREBP cleavage- activating protein – SCAP) i łączy aktywację inflammasomu NLRP3 z dojrzewaniem czynnika transkrypcyjnego SREBP2 i biosyntezą cholesterolu (Guo i in. 2018). Inne badania wskazują, że katepsyny obecne w lizosomach biorą udział w aktywacji inflamasomu NLRP3 (Orlowski i in. 2015). Dysfunkcja mitochondriów, uwalnianie do cytozolu wolnych rodników tlenowych (ang. reactive oxygen species – ROS) i mitochondrialnego DNA są dodatkowymi czynnikami, które są zaangażowane w aktywację inflammasomu

NLRP3. Podczas stresu oksydacyjnego, mitochondrialne ROS i jony Ca^{2+} współdziałają w otwarciu megakanałów mitochondrialnych zwanych porami przejściowej przepuszczalności (ang. permeability transition pore – PTP) (Lemasters i in. 2009). Wykazano, że uwolnienie mitochondrialnego DNA do cytoplazmy było zależne od otwarcia megakanałów mitochondrialnych i ROS (Nakahira i in. 2011). Ponadto stymulacja aktywatorami NLRP3 powodowała szybkie uwolnienie mitochondrialnego DNA oraz jego utlenienie (Shimada i in. 2012). Niektóre dane literaturowe wskazują mitochondrium jako miejsce przyłączenia inflamasomu. W procesie tym uczestniczą przynajmniej 3 białka. Jednym z nich jest kardiolipina, która podczas stresu mitochondrialnego przemieszcza się z wewnętrznej na zewnętrzną część błony mitochondrium i wiąże się z NLRP3 oraz CASP1, dzięki czemu dochodzi do aktywacji inflamasomu NLRP3 (Elliott i in. 2018; Iyer i in. 2013). Drugim białkiem jest mitochondrialne przeciwwirusowe białko sygnałowe (ang. mitochondrial antiviral signaling protein – MAVS), które pośredniczy w przyłączeniu NLRP3 do mitochondrium i uczestniczy w jego aktywacji (Park i in. 2013; Subramanian i in. 2013). Trzecim białkiem jest mitofuzyna 2, która zlokalizowana jest na zewnętrznej stronie błony mitochondrium i bierze udział w aktywacji inflamasomu NLRP3 poprzez formowanie kompleksu z MAVS, co zaobserwowano po zainfekowaniu makrofagów wirusem grypy i wirusem zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (ang. encephalomyocarditis virus – EMCV) (Ichinohe i in. 2013).

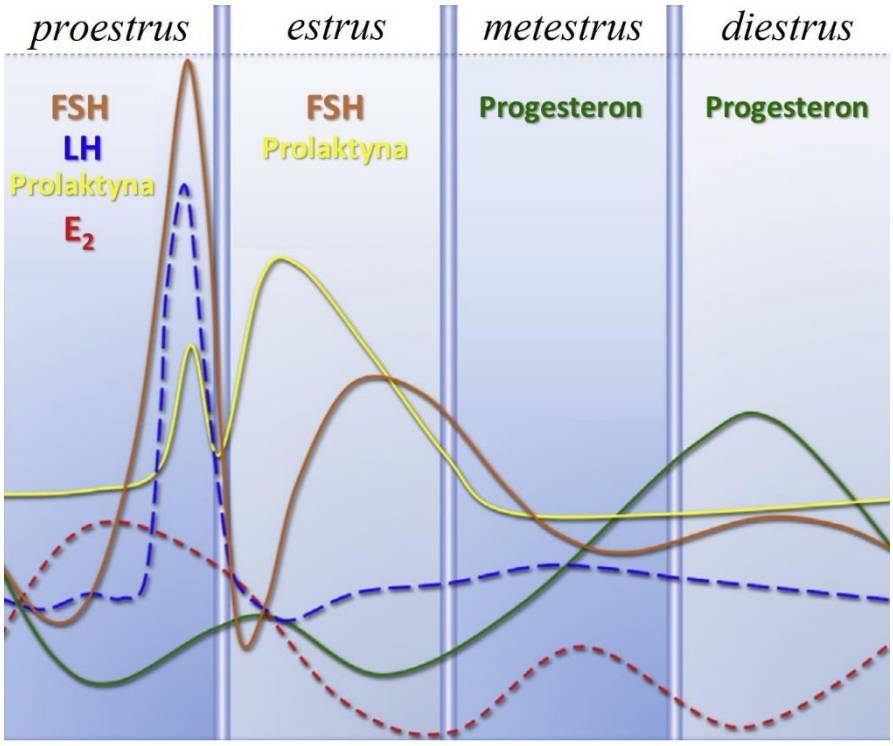
1.5. Układ rozrodczy

1.5.1. Cykl płciowy u myszy

Cykl płciowy myszy trwa zazwyczaj 4-5 dni i wyróżnia się w nim 4 fazy cyklu: przedrujową (*proestrus*), rui właściwej (*estrus*), porujową (*metestrus*), międzyrujową (*diestrus*) (Rys. 5). W trakcie każdego cyklu płciowego, w odpowiedzi na hormony steroidowe takie jak 17β-estradiol (E_2) i progesteron (P_4), w endometrium zachodzą liczne zmiany obejmujące proliferację komórek, apoptozę, angiogenezę czy infiltrację leukocytów zarówno u ludzi jak i u myszy (Evans i in. 1990). Faza *proestrus* cyklu płciowego myszy odzwierciedla fazę pęcherzykową cyklu menstruacyjnego u ludzi i jest określana na podstawie przedowulacyjnego wzrostu poziomu E_2 oraz niewielkiego wzrostu prolaktyny (Hawkins & Matzuk 2008; Parkening i in. 1982; Walmer i in. 1992). Wzrost E_2 pośrednio stymuluje neurony wykazujące ekspresję gonadoliberyny

(ang. Gonadotropin-releasing hormone – GnRH) w podwzgórzu, które aktywują komórki przedniego płata przysadki do uwalniania hormonu luteinizującego (ang. luteinizing hormone - LH) oraz hormonu folikulotropowego (ang. follicle-stimulating hormone – FSH) do krwi (Rajendren & Gibson 2001; Sarkar i in. 1976). Szczyt poziomu FSH u myszy oznacza owulację i wejście w fazę *estrus* (Kumar i in. 1997; Montgomery i in. 1988). W trakcie fazy *estrus* poziom E_2 obniża się a prolaktyna osiąga swój szczyt (Parkening i in. 1982; Walmer i in. 1992). Rozpoczęcie fazy *metestrus* zbiega się ze stałym wzrostem poziomu P_4, odzwierciedlając rozpoczęcie fazy lutealnej u ludzi (Mihm i in. 2011; Walmer i in. 1992). Ponadto dochodzi do niewielkiego wzrostu E_2 w odpowiedzi na aktywację CL (Appelgren 1969; Sander i in. 2009; Walmer i in. 1992). Podczas fazy *diestrus* dochodzi do osiągnięcia szczytu uwalniania P_4, co odzwierciedla późną fazę lutealną u ludzi (Mihm i in. 2011; Walmer i in. 1992). Regresja CL prowadzi do ostrego spadku poziomu P_4 (Rudolph i in. 2012; Stocco i in. 2007).

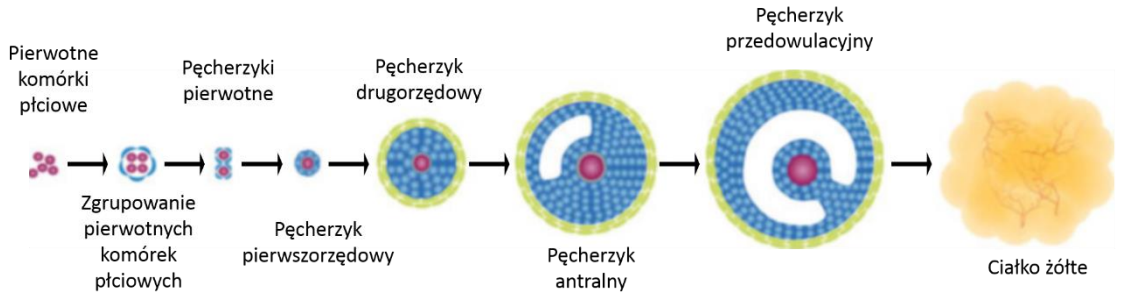
Rola leptyny podczas cyklu płciowego nie jest do końca znana. Większość badań wskazuje na znaczne różnice w poziomie leptyny w trakcie cyklu miesiączkowego u ludzi. Najniższy poziom leptyny obserwowano we wczesnej fazie pęcherzykowej, po której następował wzrost osiągając najwyższy poziom w późnej fazie lutealnej. Część badań wykazało u kobiet szczytowy poziom leptyny w pobliżu wyrzutu LH (Ahrens i in. 2014; Cella i in. 2000; Salem 2021). Co istotne, w badaniach na myszach wykazano, że HFD powoduje wydłużenie fazy *diestrus* i skrócenie fazy *estrus* (Hohos i in. 2018; Nteeba i in. 2014). To pokazuje, że leptyna może odgrywać ważną rolę w regulacji cyklu płciowego u myszy.



Rys. 5. Cykl płciowy u myszy. Skróty: FSH – hormon folikulotropowy, LH – hormon luteinizujący, E_2 – 17β-estradiol (wg Bertolin & Murphy 2014 zmodyfikowany).

1.5.2. Regulacja hormonalna wzrostu pęcherzyków jajnika

W procesie folikulogenezy (rozwoju pęcherzyków) możemy wyróżnić kilka etapów (Rys. 6). Pęcherzyk pierwotny przekształca się w pęcherzyk pierwszorzędowy, a następnie w drugorzędowy. W kolejnym etapach tworzy się pęcherzyk antralny, a następnie pęcherzyk przedowulacyjny, który po uwolnieniu oocytu przekształca się w CL (Rimon-Dahari i in. 2016).



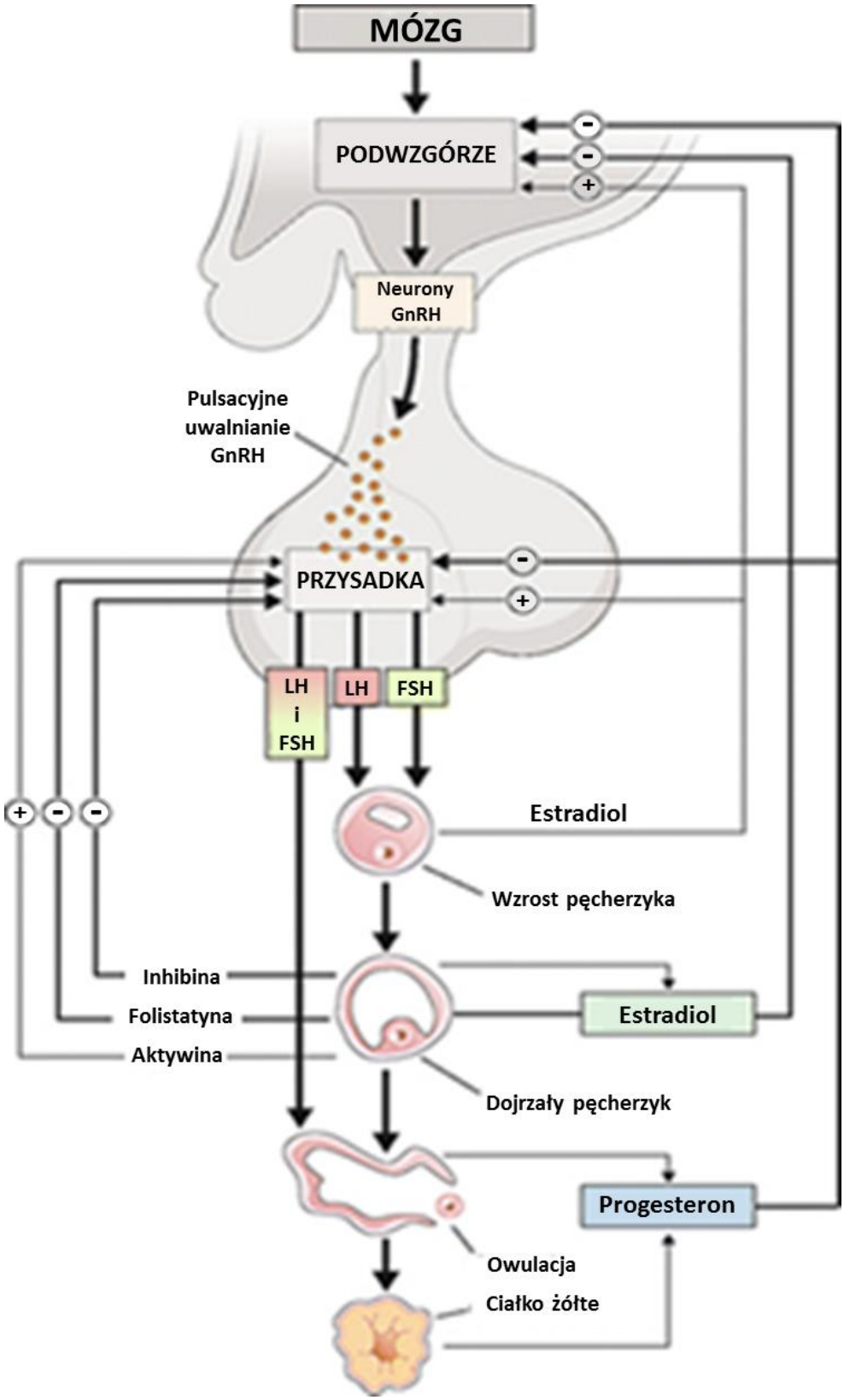
Rys. 6. Folikulogeneza. Kolorami zaznaczono następujące rodzaje komórek: różowy – oocyt, niebieski – komórki ziarniste, zielony – komórki osłonki, żółty – komórki luteinowe (wg Rimon-Dahari i in. 2016, zmodyfikowany).

Pęcherzyk pierwszorzędowy otoczony pojedynczą warstwą GCs powstaje u człowieka w życiu płodowym, z kolei u myszy 1-2 dni po urodzeniu (Edson i in. 2009; van den Hurk & Zhao 2005). Proliferacja kolejnych warstw GCs otaczających oocyt

doprowadza do utworzenia pęcherzyka drugorzędowego. Podczas tej fazy oocyt zwiększa swoją objętość o czym świadczy zwiększenie ilości RNA, białek, kropli lipidowych, a także liczby rybosomów i mitochondriów (van den Hurk & Zhao 2005). Gdy rozwijający się pęcherzyk ma już dwie warstwy GCs, na zewnątrz od nich tworzy się dodatkowa odrębna morfologicznie warstwa komórek somatycznych osłonki (Hirshfield 1991a). Komórki wewnętrznej warstwy osłonki (ang. theca cells – TCs), które tworzą się zaraz za błoną podstawną otaczającą GCs, posiadają mitochondria o grzebieniach rurkowatych, siateczkę śródplazmatyczną gładką oraz liczne krople lipidowe (Magoffin 2005). Komórki zewnętrznej warstwy osłonki, tworzą fibroblasty, komórki mięśni gładkich oraz makrofagi pełniące istotną rolę podczas owulacji. Komórki osłonki różnicują się z komórek mezenchymalnych zrębu jajnika przylegających do rozwijających się pęcherzyków (Hirshfield 1991b). Warstwa osłonki wewnętrznej staje się coraz bardziej unaczyniona wraz ze wzrastającym pęcherzykiem, natomiast w warstwie GCs brak jest naczyń krwionośnych (Knight i in. 2012). Dalsze dojrzewanie pęcherzyka drugorzędowego jest zależne od gonadotropin. Gonadoliberyna jest kluczowym dekapeptydem podwzgórza, uwalnianym w sposób pulsacyjny, o różnej częstotliwości i amplitudzie, który reguluje uwalnianie FSH i LH z przedniej części przysadki (Savoy-Moore & Swartz 1987; Wildt i in. 1981) (Rys. 7). Po przyłączeniu się FSH do receptorów FSH na powierzchni GCs, dochodzi do wzrostu pęcherzyka jajnikowego oraz tworzenia się jamki (antrum). Po przyłączeniu się LH do receptorów LH na powierzchni TCs, dochodzi do syntezy androgenów z cholesterolu. Kluczowymi enzymami biorącymi udział w tym procesie są białka StAR (ang. steroidogenic acute regulatory protein – StAR), cytochrom P450scc (ang. cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 - CYP11A1), konwertujący cholesterol do pregnenolonu, CYP17A1, konwertujący pregnenolon do dihydroepiandrosteronu (DHEA), dehydrogenazy 3β-hydroksysteroidowej (ang. 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase - 3β-HSD), konwertująca DHEA do androstendionu (Magoffin 2005). Jednakże enzymy potrzebne do przekształcenia androstendionu w E_2, takie jak cytochrom $P450_{arom}$ (CYP19A1) oraz 3β-HSD, znajdują się w GCs, które są pod kontrolą FSH (Magoffin 2005). Zwiększające się stężenie E_2 wysyła sygnał do mózgu na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego, powodując obniżenie uwalniania FSH. Duże pęcherzyki jajnikowe pozostają wrażliwe na zmniejszający się poziom FSH, a mniejsze ulegają degeneracji. Ponadto wysoki poziom E_2 produkowanego przez GCs, powoduje zwiększenie częstotliwości pulsów uwalniania GnRH, która stymuluje wyrzut LH (Richards & Pangas

2010). Efektem tego jest wznowienie mejozy w oocycie, ekspansja komórek wzgórka jajonośnego (ang. cumulus cells - CCs), a także pęknięcie ściany pęcherzyka i uwolnienie zdolnego do zapłodnienia oocytu. Pozostałe GCs i TCs różnicują się w procesie luteinizacji do komórek luteinowych tworząc CL (Edson i in. 2009). Utworzenie CL wiąże się z obszerną przebudową tkanki, a także zmiany w macierzy pozakomórkowej (ang. extracellular matrix – ECM), umożliwiającej migrację komórek i tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Ciałko żółte jest wyjątkowo silnie unaczynionym gruczołem, dzięki czemu skutecznie dostarczane składniki odżywcze, hormony i cholesterol do komórek luteinowych ułatwia wydajną produkcję i uwalnianie P_4 (Ferrara i in. 1998; Wulff i in. 2000). Wysoki poziom P_4 może hamować wiązanie E_2 do jego receptora poprzez blokowanie miejsca wiążącego, czego efektem jest przekształcenie w mniej aktywną formę – estron (Erickson i in. 1985). Ponadto krążący we krwi P_4 może blokować receptory FSH i LH co zapobiega wzrostowi nowych pęcherzyków jajnikowych (Nippoldt i in. 1989). Komórki ziarniste produkują dodatkowo inhibinę, która hamuje uwalnianie FSH w pozostałych pęcherzykach, które nie są dominujące. Z kolei aktywina, stymuluje uwalnianie FSH i zwiększa wrażliwość FSH w jajniku (Kitaoka i in. 1988). Folistatyna jest dodatkowym hormonem, który hamuje uwalnianie FSH z przedniego płata przysadki (Robertson i in. 1987; Ueno i in. 1987).

Powyższe doniesienia wskazują, że folikulogeneza i steroidogeneza są bardzo złożonymi procesami, w które zaangażowanych jest wiele czynników.



Rys. 7. Schematyczne przedstawienie głównych hormonów biorących udział w regulacji osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Skróty: LH – hormon luteinizujący, FSH – hormon folikulotropowy, GnRH – gonadoliberyna (wg Antoniou-Tsigkos i in. 2018, zmodyfikowany).

1.5.3. Rola interleukiny-1β i interleukiny-18 w jajniku

1.5.3.1. Rola interleukiny-1β w jajniku

Interleukina-1β, należy do cytokin prozapalnych produkowanych głównie przez makrofagi, monocyty, ale także limfocyty, neutrofile, fibroblasty i komórki śródbłonka (Gabay i in. 2010). Interleukina-1α, IL-1β i ich fizjologiczny antagonista IL-1Ra (ang. IL-1R antagonist) stanowią ligandy dla receptorów IL-1 typu 1 (IL-1R1) i typu 2 (IL-1R2), które mogą być związane z membraną lub występować w formie rozpuszczalnej. Podczas gdy IL-1R1 przewodzi sygnał, IL-1R2 nie wykazuje takiej zdolności (Popovic i in. 2019). Zarówno IL-1α i IL-1β są syntetyzowane jako nieaktywne białka prekursorowe o masie 31 kDa (kilodaltonów), których przekształcenie do form aktywnych (o masie cząsteczkowej 17 kDa) następuje przy udziale proteaz (CASP1, elastaza, proteinaza 3, katepsyna G, chymazy, granzym A) (Dinarello 2011, 2009).

Wiele badań dotyczących ekspresji genów z rodziny IL-1 w jajniku przeprowadzono na gryzoniach (Hurwitz i in. 1991; Kol i in. 1999; Simón i in. 1994; Wang i in. 1997). Badania wykazały ekspresję *IL-1β* na poziomie mRNA w GCs, TCs i oocytach u ludzi (Barak i in. 1992; Carlberg i in. 2000; José de los Santos i in. 1998; Zolti i in. 1991) i myszy (Simón i in. 1994). Barwienia immunohistochemiczne (ang. Immunohistochemistry – IHC) potwierdziły lokalizację IL-1β w TCs wzrastających pęcherzyków jajnikowych u myszy (Simón i in. 1994). Ponadto zaobserwowano zwiększoną ekspresję IL-1β oraz obecność makrofagów wewnątrz CL u myszy (Simón i in. 1994). U ludzi ekspresja *IL-1β* na poziomie mRNA wzrasta w GCs w trakcie pęknięcia pęcherzyka, co podkreśla rolę IL-1β w owulacji (Machelon i in. 1995). Poza tym wykryto zwiększoną ekspresję IL-1β na poziomie mRNA i białka w makrofagach pochodzących z płynu pęcherzykowego kobiet (Machelon i in. 1995).

U szczurów wykryto ekspresję *Il-1β* na poziomie mRNA w niedojrzałych jajnikach, która znacznie zwiększyła się po stymulacji końską gonadotropiną kosmówkową (ang. equine chorionic gonadotropin - eCG) (Hurwitz i in. 1991). W niedojrzałych GCs szczurów IL-1β powodowała hamowanie skumulowanego P_4 (Donesky i in. 1998). Badania przeprowadzone *in vitro* na GCs szczura wykazały, że ich stymulacja IL-1β zmniejsza ekspresję receptorów LH (Gottschall i in. 1988), a także przyczynia się do przejścia ze stanu proliferacji do różnicowania GCs, co może sugerować jej rolę w atrezji lub dalszym rozwoju pęcherzyka jajnikowego (Karakji

& Tsang 1995). W hodowli pęcherzyków przedowulacyjnych szczura IL-1β, w zależności od podanej dawki, powodowała zwiększoną produkcję prostaglandyny (PG) E, $PGF_{2\alpha}$, prostacyklin i P_4 (Brännström i in. 1993). Co więcej, IL-1β modulowała produkcję PGE w GCs, uczestnicząc tym samym w określeniu miejsca pęknięcia pęcherzyka jajnikowego (Field i in. 2014; Hurwitz i in. 1995). W hodowli komórek luteinowych bydła w obecności IL-1β zaobserwowano zwiększenie produkcji 6-keto-PGF1-α, PGE2, i $PGF_{2\alpha}$ (Nothnick & Pate 1990).

Powyższe informacje potwierdzają zasadniczą rolę IL-1β w regulacji folikulogenezy, owulacji i funkcjonowaniu CL, a także jej wpływ na zmiany funkcjonalne i strukturalne na wszystkich etapach cyklu jajnikowego.

1.5.3.2. Rola interleukiny-18 w jajniku

Interleukina-18 jest cytokiną prozapalną, syntetyzowaną jako cząsteczka prekursorowa o masie 24 kDa. Przy udziale CASP1 przekształcana jest do formy aktywnej o masie cząsteczkowej 18 kDa i uwalniana m. in. z monocytów i makrofagów (Dinarello 2018). Makrofagi i komórki dendrytyczne są głównym źródłem uwalniania aktywnej formy IL-18 (Dinarello 2018). Cząsteczki prekursorowe IL-18 są także uwalniane z umierających komórek i przekształcane do formy aktywnej pozakomórkowo, najczęściej przez neutrofile przy udziale proteinazy 3 (Sugawara i in. 2001). Receptor IL-18 zbudowany jest z dwóch podjednostek: podjednostki wiążącej - oznaczanej symbolem IL-18Rα o niskim powinowactwie, oraz podjednostki sygnalizującej - oznaczanej symbolem IL-18Rβ, która po związaniu z podjednostką IL-18Rα przekazuje sygnał do wnętrza komórki. Białko rozpuszczalne IL-18BP (ang. IL-18 binding protein – IL-18-BP) poprzez związanie IL-18 reguluje jej aktywność zapobiegając połączeniu z receptorami na komórkach układu immunologicznego (Sims & Smith 2010). U zdrowych osób poziom IL-18BP w surowicy jest 20-krotnie większy w porównaniu do IL-18, jednak podczas stanu zapalnego stosunek ten ulega zmianie (Dinarello 2018).

Ekspresja IL-18 i jej receptora na poziomie mRNA i białka jest bardzo niska w jajnikach niedojrzałych płciowo myszy (Tsuji i in. 2001). Poza tym stymulacja eCG i ludzką gonadtropiną kosmówkową (ang. human chorionic gonadotropin – hCG) powodowała znaczny wzrost ekspresji IL-18 oraz jej receptora na poziomie mRNA w fazie okołoowulacyjnej, a następnie nieznaczny jej spadek podczas fazy *diestrus* w CL myszy (Tsuji i in. 2001). Ponadto wykazano obecność IL-18 w płynie pęcherzykowym

oraz ekspresję IL-18 i jej receptora w GCs u kobiet (Salmassi i in. 2017). Dodatkowo zaobserwowano zwiększone stężenie IL-18 w surowicy w porównaniu do stężenia w płynie pęcherzykowym (Salmassi i in. 2017). Wyższe stężenie IL-18 w płynie pęcherzykowym było pozytywnie skorelowane z szansą zajścia w ciążę, podczas gdy obniżony poziom IL-18 u kobiet skutkował niepłodnością idiopatyczną (Sarapik i in. 2012). Hodowla TCs bydła w obecności IL-18 zwiększyła proliferację komórek oraz ekspresję genów związanych ze steroidogenezą (Zhang i in. 2021).

Literatura dotycząca roli IL-18 w jajniku jest zdecydowanie uboższa w stosunku do IL-1β, jednak powyższe badania potwierdzają udział IL-18 we wszystkich etapach cyklu jajnikowego.

1.5.4. Wpływ otyłości na funkcjonowanie jajnika

Podczas przewlekłego stanu zapalnego obserwuje się nieregularną syntezę i uwalnianie chemokin i cytokin (Snider & Wood 2019). W odpowiedzi na czynniki patogenne, makrofagi, komórki dendrytyczne, neutrofile, limfocyty T oraz GCs i TCs wydzielają chemokiny, które rekrutują dodatkowe leukocyty do jajników. Natomiast ogromna ilość cytokin wytwarzana w ww. komórkach, reguluje funkcje komórek somatycznych podczas wzrostu pęcherzyków jajnikowych i owulacji (Snider & Wood 2019).

Otyłość jest ściśle powiązana z zaburzeniami funkcjonowania układu rozrodczego oraz niepłodnością u kobiet (Chu i in. 2007). Badania płynu pęcherzykowego otyłych kobiet wykazały zwiększone stężenie białka C-reaktywnego (ang. C-reactive protein – CRP) (Gonzalez i in. 2018). Co więcej stężenie IL-18 w płynie pęcherzykowym kobiet z zespołem policystycznych jajników (ang. Polycystic Ovary Syndrome - PCOS) było znacznie wyższe w porównaniu do grupy osób z prawidłową masą ciała, ale niższe niż u otyłych kobiet z PCOS (Zhang i in. 2020). Ponadto u otyłych matek z niewydolnością jajników zaobserwowano lipotoksyczność, stres siateczki śródplazmatycznej, a także dysfunkcję mitochondriów (Wu i in. 2010). W końcowym efekcie, dysfunkcja jajników u otyłych matek skutkuje niską jakością oocytów oraz nieprawidłowym rozwojem zarodków (Minge i in. 2008), a także niepowodzeniem implantacji zarodka (Chu i in. 2007; Penzias 2012; Robker 2008).

W jajniku otyłych myszy HFD prowadzi do zmniejszenia liczby pęcherzyków pierwotnych, a także infiltracji makrofagów (Skaznik-Wikiel i in. 2016). Poza tym

obserwuje się zwiększoną aktywność apoptotyczną, a także zmniejszoną liczbę dojrzałych oocytów u myszy (Jungheim i in. 2010). U myszy karmionych HFD oraz myszy *ob/ob* zaobserwowano zaburzenia w dojrzewaniu oocytów, a także zwiększoną ekspresję enzymów zaangażowanych w indukcję stresu oksydacyjnego (Hou i in. 2016; Wang i in. 2018). Badania przeprowadzone przez Nteeba i in. 2013 wykazały zwiększoną ekspresję *Il-1β, Il-6, Tnf-α, p55, p75, Ccl2, Ikbkb,* i *Rela* na poziomie mRNA w jajnikach myszy karmionych HFD przez okres 7 miesięcy (Nteeba i in. 2013). Inne badania przeprowadzone na myszach karmionych przez 12 tyg. HFD (o zawartości tłuszczu 45% i 60%) i stymulowanych hormonami (hCG i eCG), wykazały zwiększoną ekspresję *Tnf-α* na poziomie mRNA w jajnikach, podczas gdy ekspresja *Il-1β, Il-6* i *Ccl2* nie zmieniła się w porównaniu do grupy kontrolnej karmionej dietą standardową (ang. chow diet – CD) (Xie i in. 2016). Dodatkowo zaobserwowano zwiększoną fosforylację STAT3 oraz NFκB p65, wskazując na translokację tych czynników do jądra komórkowego, gdzie łącząc się z promotorem mogą regulować ekspresję genów cytokin (Xie i in. 2016). W jajniku myszy agouti, które charakteryzują się otyłością, cukrzycą typu 2 i insulinoopornością, wykazano zmniejszoną ekspresję dla *Il-1β* na poziomie mRNA w 12 i 24 tyg. życia, a także zwiększoną ekspresję w 18 tyg. życia w porównaniu do myszy kontrolnych (Nteeba i in. 2014). U szczurów karmionych HFD obserwowano zmniejszenie liczby nie tylko pęcherzyków pierwotnych, ale także zwiększenie liczby pęcherzyków rozwijających się oraz atrezję pęcherzyków (Wang i in. 2014).

Podczas gdy fizjologiczna ekspresja cytokin i chemokin jest konieczna dla prawidłowego funkcjonowania jajników, powyższe dane potwierdzają, że zwiększona lub nieprawidłowa ich ekspresja powyżej poziomu progowego podczas otyłości, może upośledzać funkcjonowanie jajników.

1.5.4.1. Rola leptyny w patogenezie dysfunkcji jajników podczas otyłości

Plejotropowe działanie leptyny obejmuje m.in. układ rozrodczy (Childs i in. 2021). Leptyna moduluje działanie żeńskiego układu rozrodczego przez mechanizmy endo- i neuroendokrynne, ale także działa lokalnie w jajniku, w szczególności kontrolując steroidogenezę (Hausman i in. 2012), folikulogenezę (Brannian & Hansen 2002) i funkcjonowanie CL (Galvão i in. 2012). Leptyna i jej receptory są obecne w GCs, oocytach u kobiet i gryzoni (Karlsson i in. 1997; Ryan i in. 2002). Co ważne, podwyższony lub obniżony poziom leptyny może prowadzić do zaburzeń płodności

i funkcjonowania jajników (Childs i in. 2021). Na istotną rolę leptyny w układzie rozrodczym wskazuje fakt, że podanie jej myszom pozbawionych genu leptyny (myszy *ob/ob*) prowadzi do przywrócenia im płodności (Chehab i in. 1996). Dlatego do badań wpływu otyłości na jajniki wykorzystuje się różne modele badawcze (Huang-Doran & Franks 2016).

Stężenie leptyny w krwiobiegu osób otyłych szybko rośnie ze względu na jej korelację z masą tkanki tłuszczowej (Considine i in. 1996; Maffei i in. 1995). U otyłych kobiet można zaobserwować wysoki poziom leptyny w osoczu (hiperleptynemię) oraz rozwijającą się niewrażliwość na egzogenne podanie leptyny, czyli stan określany jako leptynooporność. Zatem hiperleptynemia i leptynooporność to dwie główne cechy towarzyszące otyłości, które mogą negatywnie wpływać na funkcjonowanie jajników. Co więcej, leptyna jest dobrze znanym regulatorem funkcjonowania jajników (Karlsson i in. 1997; Ryan i in. 2002), tak więc zmiany w szlaku sygnałowym leptyny w jajniku otyłych matek potencjalnie mogą wpływać na wzrost pęcherzyków, dojrzewanie oocytów oraz owulację (Wołodko i in. 2021). W badaniach na myszach karmionych HFD, wykazano, że leptynooporność przebiega w etapach. Początkowo utrzymuje się wrażliwość tkanek na podanie leptyny, potem następuje niewrażliwość tkanek obwodowych, ale pozostaje właściwa odpowiedź centralnego układu nerwowego na podanie leptyny i wreszcie późna faza, w której myszy rozwijają oporność na leptynę w centralnym układzie nerwowym (Enriori i in. 2006). We wczesnej fazie otyłości stan hiperleptynemii oraz zwiększona aktywacja szlaku sygnałowego leptyny może negatywnie wpływać na folikulogenezę, zmiany w syntezie i uwalnianiu steroidów we wzrastających pęcherzykach, a także dojrzewanie oocytów (Brannian & Hansen 2002). Natomiast leptynooporność obserwowana w poźnej fazie otyłości, może wpływać na zaburzenia owulacji, a także zwiększoną rekrutację pęcherzyków pierwotnych, prowadząc do przedwczesnej niewydolności jajników (Moslehi i in. 2018; Pérez-Pérez i in. 2015). W jajniku myszy karmionych HFD, wykazano rozwój leptynooporności głównie za pośrednictwem SOCS3 (Wołodko i in. 2020). W grupie myszy 4 tyg. HFD odnotowano hiperaktywację szlaku sygnałowego leptyny w jajniku myszy oraz zwiększoną fosforylację SOCS3, natomiast u myszy 16 tyg. HFD zaobserwowano zahamowanie aktywacji LepRb i leptynooporność (Wołodko i in. 2020). Co ciekawe, inne narządy takie jak serce czy nerki utrzymują swoją wrażliwość na leptynę przez cały okres trwania otyłości (Mark i in. 2002; Morgan i in. 2008). Zatem

stan otyłości ma wpływ na aktywność szlaku sygnałowego leptyny, która różni się w poszczególnych narządach. Ponadto obserwowana w trakcie rozwoju otyłości leptynooporność jest stanem patologicznym, mogącym prowadzić do zaburzeń szlaku sygnałowego leptyny i tym samym dysfunkcji jajników.

1.6. Wpływ zaburzeń metabolizmu na aktywność inflamasomu NLRP3

Przykładem wyspecjalizowanego organu, który reguluje homeostazę lipidów za pomocą skomplikowanych, ale precyzyjnie regulowanych szlaków biochemicznych jest wątroba. W warunkach fizjologicznych wątroba przekształca duże ilości kwasów tłuszczowych (ang. fatty acids – FA) i przechowuje tylko drobną ich ilość w postaci triglicerydów (TG) - około 5% (Browning i in. 2004). Wynika to z tego, że szybkość pozyskiwania FA przez pobieranie z osocza i syntezę *de novo* w wątrobie są zrównoważone ze stosunkiem utleniania FA i uwalniania bogatych w TG lipoprotein niskiej gęstości (ang. very low-density lipoprotein - VLDL). Względnie małe ilości TG są magazynowane w cytoplazmatycznych kroplach lipidowych komórek wątroby (Alves-Bezerra & Cohen 2017). Glukoza jest wykorzystywana w wątrobie do lipogenezy *de novo* i jest głównym źródłem tworzenia acetylokoenzymu A (ang. acetyl coenzyme A - acetyl-CoA), który to z kolei po przekształceniu do malonylo-CoA wykorzystywany jest do produkcji kwasu palmitynowego. Powstały kwas palmitynowy poddany procesom elongacji tworzy FA, które mogą być wykorzystane do syntezy TG zamkniętych w kroplach lipidowych i upakowanych w VLDL uwalnianych do surowicy. Podczas głodu, wewnątrzkomórkowe zapasy TG są mobilizowane z adipocytów i hapatocytów w celu uwolnienia FA. W warunkach nadmiernego spożywania i insulinooporności, poziom FA wątroby jest zwiększony ze względu na wzmożoną lipolizę wewnątrz adipocytów, co prowadzi do zwiększenia poziomu FA we krwi obwodowej, a także zwiększoną syntezę lipidów *de novo* w wątrobie. Nadmiar FA nie może być wykorzystany przez szlaki oksydacyjne, a zamiast tego metabolizm FA jest ukierunkowany na syntezę TG (Alves-Bezerra & Cohen 2017). Efektem tego jest magazynowanie TG w wątrobie i nadprodukcja VLDL, czego skutkiem może być rozwój NAFLD (Birkenfeld & Shulman 2014). Badania przeprowadzone na hepatocytach wykazały, że kwas palmitynowy przyczynił się do hamowania szlaku sygnałowego insuliny poprzez aktywację szlaku JNK oraz zwiększoną produkcję ROS w mitochondriach (Nakamura i in. 2009). Akumulacja długołańcuchowych FA, takich

jak kwas palmitynowy skutkuje lipotoksycznością, a później śmiercią komórek w wielu narządach (van Herpen & Schrauwen-Hinderling 2008).

Dieta wysokotłuszczowa znacząco zwiększa aktywność inflamasomu NLRP3 u myszy w takich organach jak wątroba, nerki czy tkanka tłuszczowa (Boini i in. 2016; Chiazza i in. 2016; Stienstra i in. 2011). Inflammasom NLRP3 jest kluczowym czynnikiem przyczyniającym się do aktywacji komórek odpornościowych, uszkodzeń hepatocytów, a także zapalenia wątroby (Szabo & Petrasek 2015). Co więcej kwas palmitynowy powoduje aktywację inflamasomu NLRP3 poprzez aktywację CASP1 oraz produkcję IL-1β i IL-18 w makrofagach pochodzących ze szpiku kostnego (ang. bone-marrow-derived macrophage), czego nie zaobserwowano przy stosowaniu nienasyconych FA (kwasu oleinowego) (Wen i in. 2011). Myszy transgeniczne pozbawione genów inflamasomu (*Nlrp3* -/-, *Asc* -/- i *Casp1* -/-) karmione przez 16 tyg. HFD nie przybierały na wadze, wskazując na istotną rolę inflamasomu w rozwoju otyłości (Stienstra i in. 2011).

W płynie pęcherzykowym otyłych kobiet obserwowano zwiększone stężenie TG oraz FA, negatywnie wpływających na dojrzewanie oocytów (Yang i in. 2012). Co więcej wykazano negatywny wpływ kwasu palmitynowego na metabolizm GCs myszy (Xu i in. 2019). W badaniach przeprowadzonych przez Pantasri i in. 2015 wykazano zwiększone stężenie kwasu palmitynowego i stearynowego w płynie pęcherzykowym u kobiet w porównaniu do stężenia tych kwasów w surowicy (Pantasri i in. 2015). Ostatnie badania wykazały obecność inflamasomu NRLP3 podczas wzrostu pęcherzyków jajnikowych u myszy, sugerując jego rolę w owulacji (Zhang i in. 2019). Co ważne, zasugerowano również udział inflamasomu NLRP3 w patofizjologii PCOS (Rostamtabar i in. 2020). Od 4 miesiąca życia zaobserwowano zwiększoną ekspresję NLRP3, CASP1 i IL-β na poziomie białka w jajniku myszy oraz udział w utracie zdolności do zapłodnienia w związku z procesem starzenia się organizmu (Navarro-Pando i in. 2021).

Powyższe wskazuje, że wątroba jest wyspecjalizowanym organem, który pełni kluczową rolę w metabolizmie FA. Jajniki nie mające tak wyspecjalizowanych komórek w metabolizmie FA jak wątroba, mogą być bardziej narażone na negatywne działanie zwiększonego poziomu FA, takich jak kwas palmitynowy, którego zwiększone stężenie wykazano w płynie pęcherzykowym otyłych kobiet (Valckx i in. 2014).

2. HIPOTEZA I CELE BADAWCZE

Biorąc pod uwagę dotychczasowy stan wiedzy na temat działania leptyny, istotnym jest poznanie mechanizmu za pośrednictwem którego dochodzi do dysfunkcji jajników podczas rozwoju otyłości. Ostatnie badania wskazują na ważną rolę inflamasomu NLRP3 w funkcjonowaniu jajników. Brak jest danych w literaturze na temat wpływu leptyny na aktywność inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy.

Hipoteza badawcza

Szlak sygnałowy leptyny pośredniczy w regulacji inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy.

Cel pracy

Głównym 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.

Cele szczegółowe:

1. Określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy.

2. Określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy z wykorzystaniem modelu:

a) otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO),
b) otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy transgraniczne pozbawione genu receptora leptyny (szczep *db/db*) oraz myszy transgraniczne pozbawione genu leptyny (szczep o*b/ob*)),
c) farmakologicznej hiperleptynemii.

3. Analiza transkryptomiczna GCs myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob*.

4. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w CCs we wczesnej fazie otyłości.

5. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy.

3. MATERIAŁY I METODY

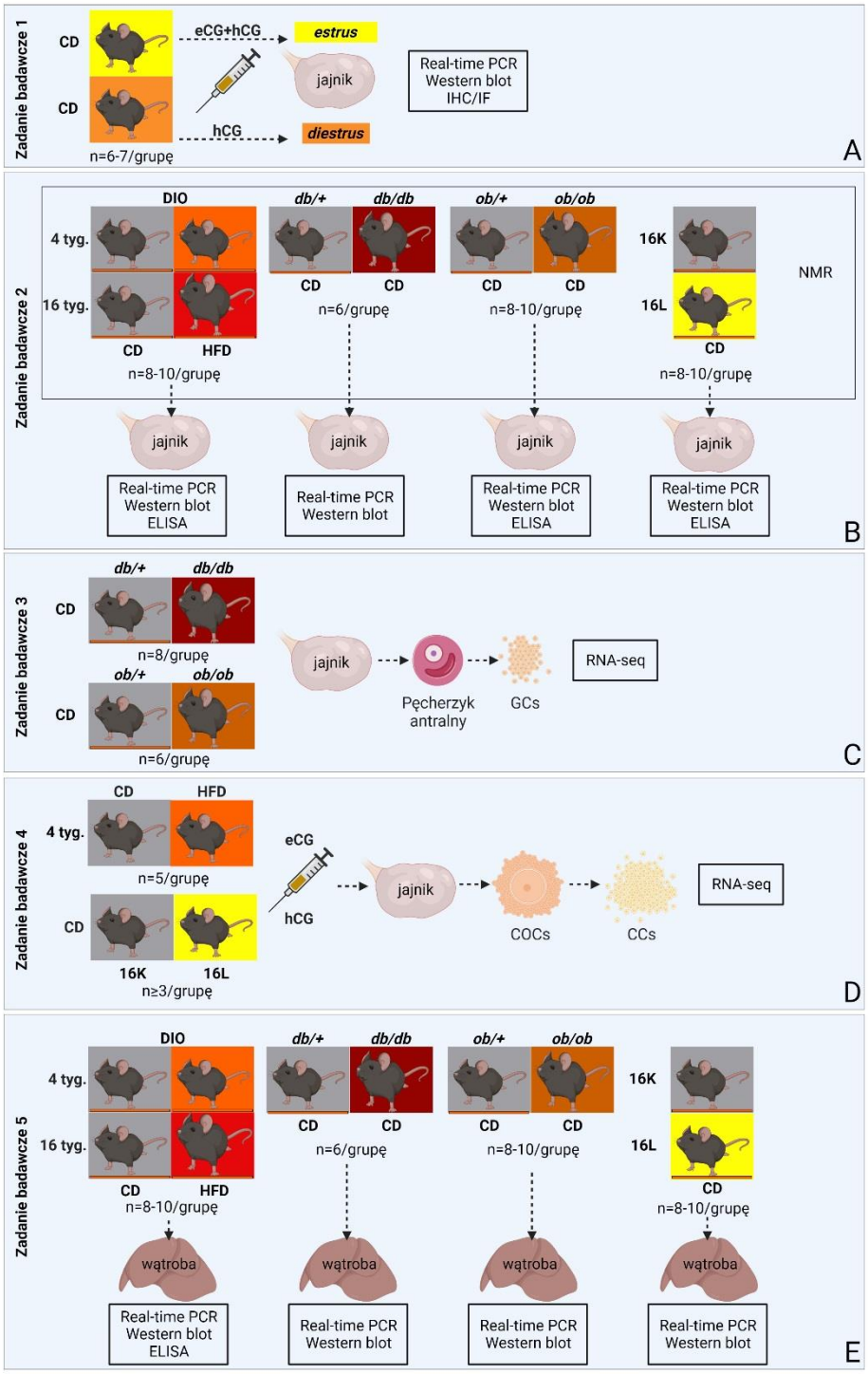
3.1 Zwierzęta

Do doświadczeń wykorzystano myszy szczepu C57BL/6J (B6), B6.Cg-Lepob/J (*ob/ob*) oraz B6.BKS(D)-Leprdb/J (*db/db*). Doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych przeprowadzono w Zwierzętarni Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Podczas trwania eksperymentów myszy przebywały w stałych warunkach środowiskowych w wentylowanych mechanicznie pomieszczeniach o wilgotności względnej 50±10% i regulowanym oświetleniu (12 h cyklu dzień/noc), w stałej temperaturze (23°C), ze stałym dostępem do wody i paszy. Samice myszy w wieku 8 tyg. zostały przydzielone do poszczególnych grup doświadczalnych.

Wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez Lokalną Komicję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie, zgodnie z założeniami Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (zgody nr 80/2015, 38/2018, 15/2018).

3.2. Schematy doświadczeń

Schematy przeprowadzonych doświadczeń wraz z zastosowanymi metodami analitycznymi przedstawiono na rys. 8.



Rys. 8. Schematy przeprowadzonych doświadczeń w poszczególnych zadaniach badawczych (A-E) wraz z zastosowanymi metodami analitycznymi. Wszystkie doświadczenia rozpoczynano na samicach myszy w wieku 8 tygodni. Skróty: DIO – model otyłości indukowanej dietą; CD - dieta standardowa, HFD – dieta wysokotłuszczowa; *db/db* - myszy pozbawione genu receptora leptyny; *db/+* - grupa myszy kontrolnych dla grupy myszy *db/db*; *ob/ob* - myszy pozbawione genu leptyny; *ob/+* - grupa myszy kontrolnych dla grupy myszy *ob/ob*; 16L – myszy szczepu C57BL/6J, którym podawano dootrzewnowo 100 µg leptyny przez 16 dni; 16K – grupa myszy kontrolnych, którym podawano sól fizjologiczną (kontrola dla grupy 16L); eCG - końska gonadotropina kosmówkowa; hCG - ludzka gonadtropina kosmówkowa; IHC – immunohistochemia; IF – immunofluorescencja; NMR - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; tyg. – tygodnie; ELISA – metoda immunoenzymatyczna; GCs – komórki ziarniste; COCs - kompleks oocyt-komórki wzgórka jajonośnego, CCs – komórki wzgórka jajonośnego; RNA-seq – sekwencjonowanie RNA.

3.2.1. Zadanie badawcze 1. Określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy

Celem doświadczenia było określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA (*Nlrp3, Casp1, Il-1β, Il-18*) oraz białka (NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18) w fazie *estrus* oraz *diestrus*, a także immunolokalizacja NLRP3 w jajniku myszy.

Doświadczenie przeprowadzono na ośmiotygodniowych myszach szczepu B6, karmionych CD (Rys. 8A). Fazy cyklu płciowego monitorowano poprzez przeprowadzenie badania cytologicznego (opisanego w podrozdziale 3.4.6.). W celu synchronizacji cyklu płciowego, myszom wstrzyknięto dootrzewnowo eCG lub hCG (Hasegawa i in. 2016). Grupie myszy będących w fazie *estrus* (n=7-8/grupę), wstrzyknięto 100 µl (50IU/ml) eCG, a następnie po 48 godz. 100 µl (50IU/ml) hCG. Jajniki pobrano 18-20 godz. później (faza *estrus*). Drugiej grupie myszy (n=6-7/grupę), wstrzyknięto 100 µl (50IU/ml) hCG, po czym pobrano jajniki 16-18 godz. później (faza *diestrus*). Pobrane jajniki mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80^{o}C do czasu określenia poziomu ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 metodą Real-Time PCR (opisaną w podrozdziałach 3.4.4.1. i 3.4.4.2.) oraz ekspresji białek metodą Western blotting (opisaną w podrozdziale 3.4.4.4.). Część jajników myszy (n=2-3) utrwalano w 4% paraformaldehydzie w celu przygotowania bloczków parafinowych i preparatów histologicznych (procedura opisana w podrozdziale 3.4.5.1.), a następnie przeprowadzenia barwienia IHC (opisanego w podrozdziale 3.4.5.2.) oraz immunofluorescencyjnego (ang. Immunofluorescence - IF) (opisanego w podrozdziale 3.4.5.3.).

3.2.2. Zadanie badawcze 2. Określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy

Celem doświadczenia było określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA (*Nlrp3, Casp1, Il-1β, Il-18*) oraz białka (NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18) w jajnikach myszy modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej

hiperleptynemii, a także stężenia IL-1β w jajnikach myszy modelu DIO, myszy *ob/ob* oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

Po przeprowadzeniu zadania badawczego nr 1 i analizie wyników, w celu zmniejszenia zmienności w obrębie grup doświadczalnych, do dalszych eksperymentów wykorzystano myszy będące w fazie *diestrus*.

W modelu DIO, ośmiotygodniowe myszy szczepu B6 (n=8-10/grupę) karmiono przez okres 4 i 16 tyg. dietą CD o niskiej zawartości tłuszczu (13% tłuszczu, #5053, Picolab Rodent diet 20,) lub dietą HFD (59% tłuszczu, AIN-76A, LabDiet) (Rys. 8B). W modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie, ośmiotygodniowe myszy homozygotyczne *db/db* (z delecją genu receptora leptyny) (n=6/grupę) i *ob/ob* (z delecją genu leptyny) (n=8-10/grupę), oraz grupę kontrolną myszy heterozygotycznych (szczupłych), karmiono przez okres 4 tyg. CD. W modelu farmakologicznej hiperleptynemii, ośmiotygodniowym myszom szczepu B6 (n=8-10/grupę) podawano dootrzewnowo leptynę (GFM26, Recombinant Mouse Leptin, Cell Guidance Systems) przez okres 16 dni (100 μg leptyny/dzień, podawana w godz. 09:00 i 21:00), a grupie kontrolnej sól fizjologiczną. Podczas trwania eksperymentu w 8, 10, 12, 18 i 24 tyg. życia monitorowano przyżyciowo parametry takie jak waga, masa tkanki tłuszczowej (ang. fat mass) i beztłuszczowej (ang. lean mass) przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. nuclear magnetic rezonance - NMR) (opisanej w podrozdziale 3.4.7.).

Pobrane jajniki mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80^{o}C do czasu określenia poziomu ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 metodą Real-time PCR (opisaną w podrozdziałach 3.4.4.1. i 3.4.4.2.), ekspresji białek metodą Western blotting (opisaną w podrozdziale 3.4.4.4.). Izolację białka z jajników wykonano zgodnie z opisem w podrozdziale 3.4.1. Stężenie IL-1β oznaczono za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA (opisanej w podrozdziale 3.4.3.).

3.2.3. Zadanie badawcze 3. Analiza transkryptomiczna komórek ziarnistych myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob*

Celem doświadczenia było porównanie profili ekspresji genów GCs pomiędzy myszami *db/db* oraz myszami *ob/ob*.

W modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie, ośmiotygodniowe homozygotyczne myszy *db/db* (n=8/grupę) i myszy *ob/ob* (n=6/grupę) oraz grupę kontrolną myszy heterozygotycznych, karmiono dietą CD przez okres 4 tyg. (Rys. 8C). Komórki ziarniste izolowano z jajników zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.3., a następnie przechowywano w temp. -80^{o}C do czasu przygotowania biblioteki do sekwencjonowania RNA (RNA-seq), zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.4.4.3., a także przeprowadzenia analiz bioinformatycznych (opisanych w podrozdziale 3.5.).

3.2.4. Zadanie badawcze 4. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w komórkach wzgórka jajonośnego we wczesnej fazie otyłości

Celem doświadczenia było określenie czy oddziaływanie pomiędzy szlakiem sygnałowym leptyny a aktywacją inflamasomu NLRP3 w jajnikach myszy występuje na poziomie komórkowym.

W realizacji powyższego celu wykorzystano wyniki z RNA-seq CCs opisane przez Wołodko i in. 2020. Komórki wzgórka jajonośnego pobierano od myszy szczepu B6 karmionych CD lub HFD przez okres 4 i 16 tyg. oraz myszy modelu farmakologicznej hiperleptynemii (Rys. 8D). Celem pozyskania CCs, u myszy wywołano superowulację poprzez wstrzyknięcie dootrzewnowo eCG, a 48 godz. później hCG. Następnie po 18 godz. od podania hCG, z jajowodów pobierano kompleks oocytu z GCs, który trawiono hialuronidazą. Po usunięciu oocytów pobierano po około 50 CCs od każdej z myszy karmionych 4 i 16 tyg. HFD (n=5/grupę) oraz farmakologicznej hiperleptynemii (n= co najmniej 3/grupę) (Wołodko i in. 2020). Z pozyskanego materiału przygotowano biblioteki i wykonano RNA-seq.

Na podstawie danych RNA-seq opublikowanych przez Wołodko i in. 2020 przeprowadzono ponowną analizę danych celem określenia poziomu ekspresji genów inflamasomu NLRP3 oraz szlaku sygnałowego leptyny w CCs w grupie myszy 4 tyg. HFD oraz modelu farmakologicznej hiperleptynemii. Dane z przeprowadzonej analizy RNAseq dostępne są pod numerem GSE1803001 w bazie danych Gene Expression Omnibus (GEO).

3.2.5. Zadanie badawcze 5. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy

Celem doświadczenia było określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA (*Nlrp3, Casp1, Il-1β, Il-18*) oraz białka (NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18) w wątrobie myszy modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii, a także stężenie IL-1β w wątrobie myszy modelu DIO.

W celu określenia zmian zachodzących w jajniku myszy podczas rozwoju otyłości na tle innych organów, wybrano wątrobę jako organ o dużej zdolności regeneracyjnej i przekształcania dużych ilości m. in. FA, których zwiększony poziom w jajniku wykazano w płynie pęcherzykowym otyłych kobiet (Browning i in. 2004; Pantasri i in. 2015; Yang i in. 2012).

Tkanki wątroby pobrano od myszy podczas realizacji zadania badawczego nr 2 (Rys. 8B, E). Wątroby mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80^{o}C do czasu określenia poziomu ekspresji genów inflamasomu NLRP3 metodą Real-Time PCR (opisaną w podrozdziałach 3.4.4.1. i 3.4.4.2.), ekspresji białek metodą Western blotting (opisaną w podrozdziale 3.4.4.4.). Ekstrakcję białka z wątroby modelu DIO wykonano zgodnie z opisem w podrozdziale 3.4.2. Stężenie IL-1β oznaczono za pomocą metody immunoenzymatycznej ELISA (opisanej w podrozdziale 3.4.3.).

3.3. Izolacja komórek ziarnistych z jajników myszy

Jajniki myszy umieszczano w medium hodowlanym M2 (M7167, Sigma Aldrich) nakłuwano igłą insulinową w celu uwolnienia kompleksu oocyt-komórki wzgórka jajonośnego (ang. cumulus-oocyte complex – COCs) z pęcherzyków antralnych. Oocyty pobierano i usuwano przy użyciu szklanych igieł i pipet o odpowiedniej średnicy. Komórki ziarniste przenoszono do probówek, wirowano przez 5 min., przy 600 x g w 4^{o}C, przepłukiwano buforem roztworu soli fizjologicznej (PBS), po czym ponownie wirowano przez 5 min. przy 600 x g w 4^{o}C i umieszczano w buforze RLT (1053393,

Qiagen). Przygotowane próby natychmiast mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80^{o}C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

3.4. Metody analityczne

3.4.1. Izolacja białka z jajników do przeprowadzenia testu immunoenzymatycznego

Jajniki umieszczano w 500 µl zimnego PBS-u zawierającego 10 µl inhibitorów proteaz (1mM PMSF i Protease Inhibitor Cocktail, P8340; Sigma-Aldrich) i fosfataz (Pierce Phosphatase Inhibitor Mini Tablets 88667; Thermo Fisher Scientific). Następnie jajniki rozgniatano przy użyciu lancety i homogenizowano z użyciem sonikatora. Po wymieszaniu prób przechowywano w -20^{o}C przez całą noc. Następnego dnia po rozmrożeniu i wymieszaniu prób, ponownie je zamrożono na 1 godz. w temperaturze -20^{o}C. Po ponownym rozmrożeniu i mieszaniu prób, wirowano przez 15 min., przy 15 000 obr./min., w temp. 4^{o}C. Zebrany nadsącz przenoszono do nowych probówek i przechowywano w temperaturze -20^{o}C do czasu pomiaru stężenia białka (opisanego w podrozdziale 3.4.4.4.1.). Następnie próby przechowywano w temperaturze -20^{o}C do czasu przeprowadzenia metody immunoenzymatycznej ELISA (opisanego w podrozdziale 3.4.3.).

3.4.2. Izolacja białka z wątroby do przeprowadzenia testu immunoenzymatycznego

Fragmenty wątroby o wadze 10 mg, wkładano do probówek z cyrkonowymi kulkami (HPLM500; Blirt) z dodatkiem 500 µl zimnego PBS-u zawierającego 10 µl inhibitorów proteaz i fosfataz. Homogenizowano w aparacie Fast Prep 24. Następnie mieszano i przechowywano w temp. -20^{o}C przez całą noc. Następnego dnia po rozmrożeniu i wymieszaniu prób, ponownie je zamrożono w temp. -20^{o}C na okres 1 godz. Po ponownym rozmrożeniu mieszano i wirowano przez 10 sek., przy 10 000 obr./min., w temperaturze 4^{o}C, po czym przenoszono homogenat do nowych probówek. Po powtórnym wirowaniu przez 15 min., przy 15 000 obr./min., w temp. 4^{o}C, nadsącz przenoszono do nowych probówek, po czym przeprowadzono pomiar stężenia białka (opisanego w podrozdziale 3.4.4.4.1.). Następnie próby przechowywano w temperaturze -20^{o}C do czasu przeprowadzenia metody immunoenzymatycznej ELISA (opisanej w podrozdziale 3.4.3.).

3.4.3. Immunoenzymatyczna analiza stężenia IL-1β

Do określenia stężenia białka dla IL-1β w jajnikach i wątrobie myszy użyto testu IL-1 beta Pro-form Mouse Uncoated ELISA (88-8014-22; Thermo Fisher Scientific) według ścisłych zaleceń producenta.

Pierwszego dnia, do 96-dołkowej płytki dodano 100 µl przeciwciał opłaszczających, specyficznych dla IL-1β (rozcieńczenie 1:250 w roztworze dostarczonym przez producenta). Płytkę inkubowano przez całą noc w temp. 4^{o}C. Następnego dnia płytkę pokrytą przeciwciałami płukano 3-krotnie z użyciem buforu płuczącego, po czym blokowano miejsca niespecyficznych wiązań dodając 200 µl roztworu blokującego i inkubując płytkę przez 1 godz. w temp. pokojowej. Po tym etapie, dodano odpowiednio 100 µl poszczególnych punktów krzywej standardowej lub badanych prób i inkubowano przez noc w temp. 4^{o}C. Kolejnego dnia płytkę płukano 5-krotnie buforem płuczącym. Następnie dodano do każdej studzienki po 100 µl przeciwciał drugorzędowych anty-IL-1β i inkubowano przez 1 godz. w temp. pokojowej. Ponownie płukano płytkę 5-krotnie buforem płuczącym, dodano 100 µl Awidyna-HRP (awidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową) (rozcieńczenie 1:250 w roztworze dostarczonym przez producenta) i inkubowano przez 30 min. w temp. pokojowej. Po inkubacji płytkę płukano 7-krotnie buforem płuczącym. W kolejnym etapie do każdej ze studzienek dodano 100 µl substratu dla HRP – 3,3′,5,5′-tetrametylbenzydyny - TMB i inkubowano bez dostępu do światła przez 15 min. w temp. pokojowej. W celu zatrzymania reakcji enzymatycznej, dodano 50 µl 2M kwasu siarkowego (H_2SO_4). Do zmierzenia absorbancji przy długości fali 450 nm wykorzystano czytnik mikropłytek Synergy H1 Hybrid Reader. Krzywa standardowa osiągała wartości w zakresie 25 pg/ml do 3000 pg/ml. Współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej wynosił 7.27%.

3.4.4. Metody biologii molekularnej

3.4.4.1. Izolacja mRNA i odwrotna transkrypcja

Procedura izolacji RNA została przeprowadzona z wykorzystaniem Trizolu (TRI reagent, T9424; Sigma Aldrich), ściśle według zaleceń producenta. Jajnik rozgnieciono w 250 µl Trizolu przy użyciu lancety w 1.5 ml probówkach (Axygen). Fragmenty wątroby o wadze 10 mg, wkładano do probówek z kulkami cyrkonowymi (HPLM500; Blirt) z dodatkiem 250 µl Trizolu. Homogenizowano z użyciem homogenizatora Fast Prep 24. Jeden cykl homogenizacji trwał 20 sek. z prędkością 5 m/s, po czym próby

inkubowano 5 minut w temperaturze 4^{o}C. Etap ten powtórzono 3-krotnie, po czym zawiesinę przeniesiono do nowej probówki. Następnie zarówno do prób jajnika i wątroby dodano Trizol uzyskując całkowitą objętość 1 ml. Próby pozostawiono na 5 min. w temp. pokojowej, po czym wirowano przez 15 min., przy 10 000 obr./min. w temp. 4^{o}C. Do nowo przygotowanych probówek przenoszono nadsącz, po czym dodano 100 µl BCP (1-bromo-3-chloropropan, BP 151; Molecular Research Center). Zawiesinę wymieszano przez 15 sek., a następnie pozostawiono na 10 min. w temp. pokojowej. W kolejnym etapie podczas wirowania przez 15 min., przy 12 000 obr./min. w temp. 4^{o}C, doszło do rozdziału i przemieszczenia się białka oraz DNA do fazy dolnej i interfazy, natomiast do fazy górnej RNA w postaci przezroczystego roztworu. Górną frakcję przeniesiono do nowo przygotowanych probówek i dodano 500 µl lodowatego izopropanolu. Dodatkowo dodano 1.7 µl odczynnika do precypitacji RNA (GlycoBlue Coprecipitant, AM9516; ThermoFisher Scientific), dzięki czemu RNA w kolejnych etapach było widoczne w postaci niebieskiego osadu na dnie probówki. Po kilkukrotnym przepipetowaniu zawiesiny, próby umieszczono na 1 godz. w temp. -80^{o}C. Po wyciągnięciu prób z zamrażarki, wirowano 15 min., przy 20 000 obr./min. w temp. 4^{o}C. Kolejno, po pobraniu nadsączu, dodano 1 ml lodowatego 70% etanolu (rozcieńczonego z wodą DEPC), po czym ponownie wirowano przez 15 min., przy 20 000 obr./min. w temp. 4^{o}C. Ten etap powtórzono dwukrotnie. Po usunięciu nadsączu ponownie dodano 1 ml lodowatego etanolu i przechowywano przez noc w temp. -80^{o}C. Następnego dnia próby wirowano przez 15 min., przy 20 000 obr./min. w temp. 4^{o}C. Na tym etapie pobrano cały nadsącz i suszono osad pod komorą laminarną przez około 40 min., po czym dodano 20 µl (jajnik) lub 40 µl (wątroba) wody wolnej od RNA-z. Tak przygotowane próby umieszczono w lodówce na 1 godz., a następnie przechowywano w temp. -80^{o}C. Kolejnego dnia dokonano oceny jakości oraz pomiar stężenia uzyskanego RNA przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Stosunek absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm ($A_{260/280}$) wynosił 2.

Do odwrotnej transkrypcji, RNA (2 µg) zostało przepisane na cDNA (komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy) wykorzystując kit Maxima First Strand cDNA (K1642; ThermoFisher Scientific) (Galvão i in. 2012). Na podstawie oznaczonego stężenia RNA, próby rozcieńczono wolną od RNA-z wodą uzyskując 8 µl roztworu. Następnie dodano 2 µl mieszaniny Reaction Buffer oraz DNAzy (w stosunku 1:1)

i inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej. Po okresie inkubacji dodano 1 µl STOP solution. Próby umieszczano w termocyklerze MJ Mini (Bio-Rad) na 10 min. w temp. 70^{o}C. Następnie próby schłodzono na lodzie i dodano 9 µl mieszaniny do odwrotnej transkrypcji (Master Mix 2) przedstawionej w tabeli 1. W kolejnym etapie reakcję odwrotnej transkrypcji kontynuowano w termocyklerze, gdzie próby inkubowano przez 10 min. w temp. 25^{o}C, następnie 15 min. w temp. 50^{o}C oraz 5 min. w temp. 85^{o}C w celu inaktywowania enzymu. Przygotowane próby przechowywano w temp. -20^{o}C do czasu przeprowadzenia analizy Real-time PCR.

Tab. 1. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji.

Składniki mieszaniny	Objętość (µl)	Mieszanina roztworów
H_2O + RNA	8	MIX 1
Reaction Buffer	1	
DNAza	1	
Stop Solution	1	-
5x Reaction Mix	4	MIX 2
Enzyme Mix	2	
H_2O	3	

3.4.4.2. Real-time PCR

W celu określenia ekspresji badanych genów metodą Real-time PCR, wykorzystano techniki fluorescencyjne umożliwiające obserwowanie zmian intensywności fluorescencji (przyrost produktu) podczas każdego cyklu reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Jako barwnika wiążącego się do dwuniciowego DNA, użyto SYBR Green I (K0223; Thermo Fisher Scientific).

Na podstawie sekwencji genów zawartych w GenBank (National Center for Biotechnology Information) zaprojektowano startery z wykorzystaniem programu Primer Express 3.0. Sekwencje starterów, długość produktu oraz numer dostępu w bazie GenBank przedstawiono w tabeli 2. Startery zawierały od 40 do 60% par nukleotydów guanidyny oraz cytozyny, ich długość wynosiła od 20 do 24 par zasad, natomiast temperatura topnienia mieściła się w granicach 58-60^{o}C. Maksymalna długość amplikonu wynosiła 190 nukleotydów. Sprawdzenie specyficzności starterów, dokonano w programie BLAST, gdzie wskaźnik istotności statystycznej (E-wartość) był minimum

100-krotnie większy w stosunku do wykrytego kolejnego genu. Odpowiednie stężenia starterów uzyskano po przeprowadzeniu doświadczenia wstępnego.

Tab. 2. Charakterystyka starterów użytych w analizie metodą Real-time PCR

Nazwa genu	**Numer dostępu GenBank**	**Sekwencja startera (5'-3')** **forward/reverse**	**Długość amplikonu (bp)**
Nlrp3	NM_145827.4	F: TGGATGGGTTTGCTGGGATA R: TGCTTGGATGCTCCTTGACC	190
Casp1	NM_009807.2	F: CATGCCGTGGAGAGAAACAA R: GGTGTTGAAGAGCAGAAAGCAA	151
IL-1β	NM_008361.4	F: TTGACGGACCCCAAAAGATG R: GCTTCTCCACAGCCACAATGA	144
Il-18	NM_008360.2	F: GAAGAAAATGGAGACCTGGAATCA R: TCTGGGGTTCACTGGCACTT	157
Rpl37	NM_026069.3	F:CTGGTCGGATGAGGCACCTA R: AAGAACTGGATGCTGCGACA	108

Reakcję amplifikacji przeprowadzono na urządzeniu 7900 Real-time System (Applied Biosystems). Profil termiczny reakcji Real-time PCR obejmował następujące etapy: 1) denaturacji wstępnej (10 min. w temp. 95^{o}C), 2) 45 powtarzających się cykli: a) denaturacja (15 sek. w temp. 95^{o}C), b) przyłączanie starterów i powielania (1 min. w temp. 60^{o}C), c) dysocjacja produktu (15 sek. w temp. 95^{o}C, 15 sek. w temp. 60^{o}C, 15 sek. w temp. 95^{o}C). Uzyskane wyniki reakcji Real-time PCR standaryzowano w oparciu o gen referencyjny: gen rybosomalnego białka 37 (ang. Ribosomal Protein L37 - *Rpl37*), który został wybrany w publikacji Wołodko i in. 2020, przy użyciu algorytmu NormFinder.

Wszystkie reakcje Real-time PCR przeprowadzono w duplikatach w 384-dołkowej płytce (4309849; Applied Biosystems), gdzie całkowita objętość reakcji wynosiła 12 µl (Galvão i in. 2014). Wyniki analizowano przy użyciu metody Minera (Zhao & Fernald 2005), zgodnie z którą wyniki uzyskuje się przy pomocy obliczeń w oparciu o kinetykę poszczególnych reakcji PCR, co umożliwia bezpośrednie obliczanie wydajności reakcji i cyklu progowego (CT).

Tab. 3. Skład mieszaniny reakcji Real-time PCR

Składnik mieszaniny	Objętość (µl) na 1 reakcję
cDNA+ddH_2O	4
SYBR Green I	6
Starter (forward)	1
Starter (reverse)	1

3.4.4.3. Przygotowanie biblioteki do RNA-seq

Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe składa się z następujących etapów: izolacji materiału genetycznego, przygotowania biblioteki, właściwego sekwencjonowania oraz bioinformatycznej analizy danych. Sekwencjonowanie przeprowadzono w Babraham Institute Sequencing Facility. W pierwszym etapie do wychwytywania mRNA zastosowano kulki magnetyczne ze wstępnie sparowanymi sekwencjami Smart-seq2 oligo-dT (MyOne C1, Invitrogen). Następnie kulki rozcieńczono w 10 µl mieszanki odwrotnej transkryptazy (100 U, SuperScript II, Invitrogen; 10 U, RNAsin, Promega), 1 x Superscript II First-Strand Buffer, 2,5 mM ditiotreitol (DTT, Invitrogen), 1 M betaina (Sigma Aldrich), 9 mM chlorek magnezu (MgCl2, Invitrogen), 1 µM Template-Switching Oligo (Exiqon), 1 mM mix trifosforan dezoksyrybonukleotydu (dNTP) (Roche) i inkubowano przez 60 min. w temp. 42°C, a następnie przez 30 min. w temp. 50°C i 10 min. w temp. 60°C (Picelli i in. 2014, 2013). Amplifikację cDNA przeprowadzono po dodaniu 11 µl 2 × KAPA HiFi HotStart ReadyMix i 1 µl 2 µM startera ISPCR (insert - Smart 2013, Full-length RNA-seq 2014) i inkubowano przez 3 min. w temp. 98^{o}C, a następnie 9 cykli przez 15 sek. w temp. 98°C, przez 20 sek. w temp. 67°C, przez 6 min.w temp. 72°C i na koniec przez 5 min. w temp. 72°C. Następnie cDNA oczyszczono za pomocą kulek AMPure (Beckman Coulter) i rozcieńczono w 20 µl wody wolnej od nukleaz (P1195; Promega). Wszystkie biblioteki przygotowano ze 100–200 pg cDNA przy użyciu zestawu Nextera XT Kit (Illumina), zgodnie z instrukcjami producenta. Ostateczne biblioteki cDNA połączono i zsekwencjonowano na Illumina Nextseq500.

3.4.4.4. Analiza Western blotting

3.4.4.4.1. Izolacja i pomiar stężenia białek

Jajniki i fragmenty tkanki wątroby (10 mg) homogenizowano w buforze RIPA (R0278; Sigma Aldrich) z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz. Następnie próby trzymano przez 1 godz. na lodzie i mieszano co 15 min. W kolejnym etapie próby wirowano przez 15 min., przy 20 000 x g w temp. 4^{o}C, a nadsącz przenoszono do nowych probówek. Do pomiaru stężenia białka użyto metodę Smitha z wykorzystaniem kwasu bicynchoninowego (ang. Bicinchoninic Acid – BCA) oraz siarczanu miedzi ($CuSO_4$) (B9643; Sigma Aldrich, C2284; Sigma Aldrich) (Smith i in. 1985). W celu określenia stężenia białka, pobrano 2,5 µl próby i rozcieńczono w wodzie destylowanej (próby rozcieńczono w stosunku 1:10 dla jajnika oraz 1:20 dla wątroby). Stężenie białek wyznaczono za pomocą krzywej standardowej względem ustalonych rozcieńczeń albuminy surowicy bydlęcej (ang. Bovine Serum Albumin - BSA). Przyjęto następującą serię rozcieńczeń dla krzywej standardowej: 1000, 800, 600, 200, 100, 50, 25 µg/ml. Zarówno krzywa standardowa jak i próby badane były nakładane na płytkę 96-dołkową w dwóch powtórzeniach w ilości 10 µl na dołek. Następnie przygotowano mieszaninę $CuSO_4$ oraz kwasu BCA w stosunku 1:50 i dodano po 300 µl roztworu do każdego dołka. Płytkę inkubowano przez 30 min. w temp. 37^{o}C. Kwas bicynchoninowy tworzy z jonami miedzi fioletowy kompleks o maksymalnej absorbancji przy długości fali 562 nm, a intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia białka. Po 5 minutach inkubacji w temp. pokojowej intensywność absorbancji odczytywano w czytniku mikropłytek Synergy H1 Hybrid Reader.

3.4.4.4.2. Rozdział elektroforetyczny

Badane próby białek po dodaniu buforu Laemmli z dodatkiem 1% β-merkaptoetanolu, umieszczano w termocyklerze na 5 min. w temp. 90^{o}C w celu denaturacji białek, a następnie umieszczano na lodzie. Na żele poliakrylamidowe (10-18%) nanoszono 40 µg białka, a następnie prowadzono elektroforezę pionową z wykorzystaniem zestawu Bio-Rad. Spośród 10 studzienek, 9 było przeznaczonych na badane próby oraz próbę kontrolną, a jako marker białkowy użyto PageRuler™ Prestained Protein Ladder (26617; Thermo Fisher Scientific). Elektroforezę prowadzono wstępnie przy natężeniu 25 Amperów (A) na godz./żel, a następnie 30 A na godz./żel.

3.4.4.4.3. Transfer białek na membranę

Po rozdziale elektroforetycznym białka przenoszono na drodze mokrego lub półsuchego transferu na membranę nitrocelulozową (10600009; GE Healthcare Life Science) lub membranę z fluorku poliwinylidenu (ang. polyvinylidene fluoride – PVDF) (IPVH00010; Merck Millipore). Transfer półsuchy prowadzono w zestawie do transferu półsuchego, Trans-Blot SD (Bio-Rad), przy stałym napięciu 15 wolt (V) przez 45 min. Transfer mokry prowadzono w zestawie do transferu mokrego, Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), przy stałym napięciu 70V przez 120 min. Skuteczność transferu potwierdzono zanurzając membranę w roztworze Ponceau S przez 2 min., a następnie odbarwiając w wodzie. W celu zablokowania miejsc niespecyficznych, membrany po transferze białek blokowano 3% odtłuszczonym mlekiem w proszku rozcieńczonym w buforze PBST przez 1 godz. w temp. pokojowej.

3.4.4.4.4. Inkubacja z przeciwciałami i detekcja białek

Membrany inkubowano przez całą noc w temp. 4^{o}C w roztworze zawierającym przeciwciała pierwszorzędowe: mysie monoklonalne dla anty-NLRP3 (1:1000; AG-20B-0014-C100; Adipogen), królicze poliklonalne dla anty-CASP1 (1:1000; ab108362; Abcam), królicze poliklonalne anty-IL-18 (1:250; ab71495; Abcam), mysie monoklonalne dla anty-β-aktyny (1:10000; A2228; Sigma Aldrich) oraz królicze poliklonalne dla anty-dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego – anty-GAPDH (1:2500; ab9485; Abcam). Następnego dnia po 3-krotnym płukaniu w buforze PBST, membrany inkubowano w temp. pokojowej w roztworze zawierającym przeciwciała drugorzędowe: poliklonalne anty-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową (1:1000, 31430; Thermo Fisher Scientific), poliklonalne anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową (1:20 000, 31460; Thermo Fisher Scientific), poliklonalne anty-mysie sprzężone z fosfatazą alkaliczną (1:1000, 31321; Thermo Fisher Scientific), poliklonalne anty-królicze sprzężone z fosfatazą alkaliczną (1:10 000, A3687, Sigma Aldrich), przez 1 godz. i 30 min. (detekcja chemiluminescencyjna) lub 2 godz. 30 min. (detekcja kolorymetryczna). Poszukiwane białka wizualizowano z wykorzystaniem chemiluminescencyjnych odczynników SuperSignal West Femto (kit, 34095; Thermo Fisher Scientific) lub chromogennego substratu NBT/BCIP (11681451001; Roche). Intensywność wykrytego prążka dla białka NLRP3 i IL-18 normalizowano względem

białka referencyjnego β-aktyny, natomiast dla CASP1 względem białka referencyjnego GAPDH. Zdjęcia wykonano z wykorzystaniem systemu do obrazowania Chemi Doc lub VersaDoc MP 4000 (Bio-Rad). Ilościową analizę densytometryczną dla każdego badanego białka przeprowadzono z wykorzystaniem programu ImageLab.

3.4.5. Metody histologiczne

3.4.5.1. Przygotowanie preparatów histologicznych

Jajniki myszy po pobraniu w fazie *diestrus*, utrwalono w 4 % paraformaldehydzie i przechowywano przez noc w 4^{o}C. Następnego dnia jajniki płukano pod bieżącą wodą celem usunięcia utrwalacza z tkanki, po czym odwodniono w 50% etanolu przez 1 godz., a następnie w 70% etanolu. Skrawki przepojono ksylenem w celu całkowitego pozbycia się wody z tkanki. W kolejnym etapie tkankę przepojono parafiną w temp. 54^{o}C, następnie w temp. 58^{o}C. Zatopione w parafinie jajniki cięto na skrawki o grubości 5 μm i umieszczono na szkiełku podstawowym SuperFrost (J1800AMNZ; Thermo Scientific), po czym pozostawiono je na 2 godz. w temp. pokojowej.

3.4.5.2. Barwienie immunohistochemiczne

Procedurę przygotowania skrawków w kierunku immunolokalizacji NLRP3 w jajniku, rozpoczęto od 2 godz. inkubacji w temp. 59^{o}C. W kolejnym etapie preparaty odparafinowano przez umieszczenie w 2 zmianach ksylenu przez okres 15 min i 10 min., a następnie nawodniono w szeregu rozcieńczeń etanolu o malejącym stężeniu (98%, 90%, 70% - po 3 min. w dwóch powtórzeniach). Następnie preparaty przeniesiono do wody destylowanej na 5 min. Celem odsłonięcia determinant antygenowych, preparaty gotowano w buforze cytrynianowym (10 mM, pH = 6) przez 40 min. w temp. 90^{o}C. Następnie dodano roztworu blokującego (2% BSA rozcieńczony w PBS), inkubowano przez 1 godz. w temp. pokojowej, a następnie preparaty inkubowano przez noc w 4^{o}C z przeciwciałami króliczymi poliklonalnymi dla anty-NLRP3 (1:200, ab214185; Abcam). Kontrole negatywne stanowiły skrawki inkubowane z przeciwciałami króliczymi poliklonalnymi dla anty-immunoglobuliny typu G (IgG, ab37415; Abcam) lub bez przeciwciał pierwszorzędowych. Następnego dnia, skrawki płukano 6-krotnie i inkubowano przez 1 godz. w temp. pokojowej z poliklonalnymi przeciwciałami drugorzędowymi kozimi anty-króliczymi IgG skoniugowanymi z peroksydazą (1:100,

410972; Dako). Następnie preparaty inkubowano przez 15 sekund za pomocą 3,3′-diaminobenzydyny, chromogenem dającym brązową reakcję barwną. Dodatkowo preparaty barwiono hematoksyliną przez 2 min. Wybarwione preparaty poddano dehydratacji, po czym zamyknięto w DPX (mieszaninie toluenu, ksylenu i ftalanu dibutylu).

Zdjęcia preparatów wykonywano z wykorzystaniem mikroskopu Zeiss Axio Observer System (Carl Zeiss, Germany) i obiektywem o 20-krotnym powiększeniu oraz aperturze numerycznej 0.4. Do analizy zdjęć użyto oprogramowania Observer Systems Z1 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

3.4.5.3. Barwienie immunofluorescencyjne

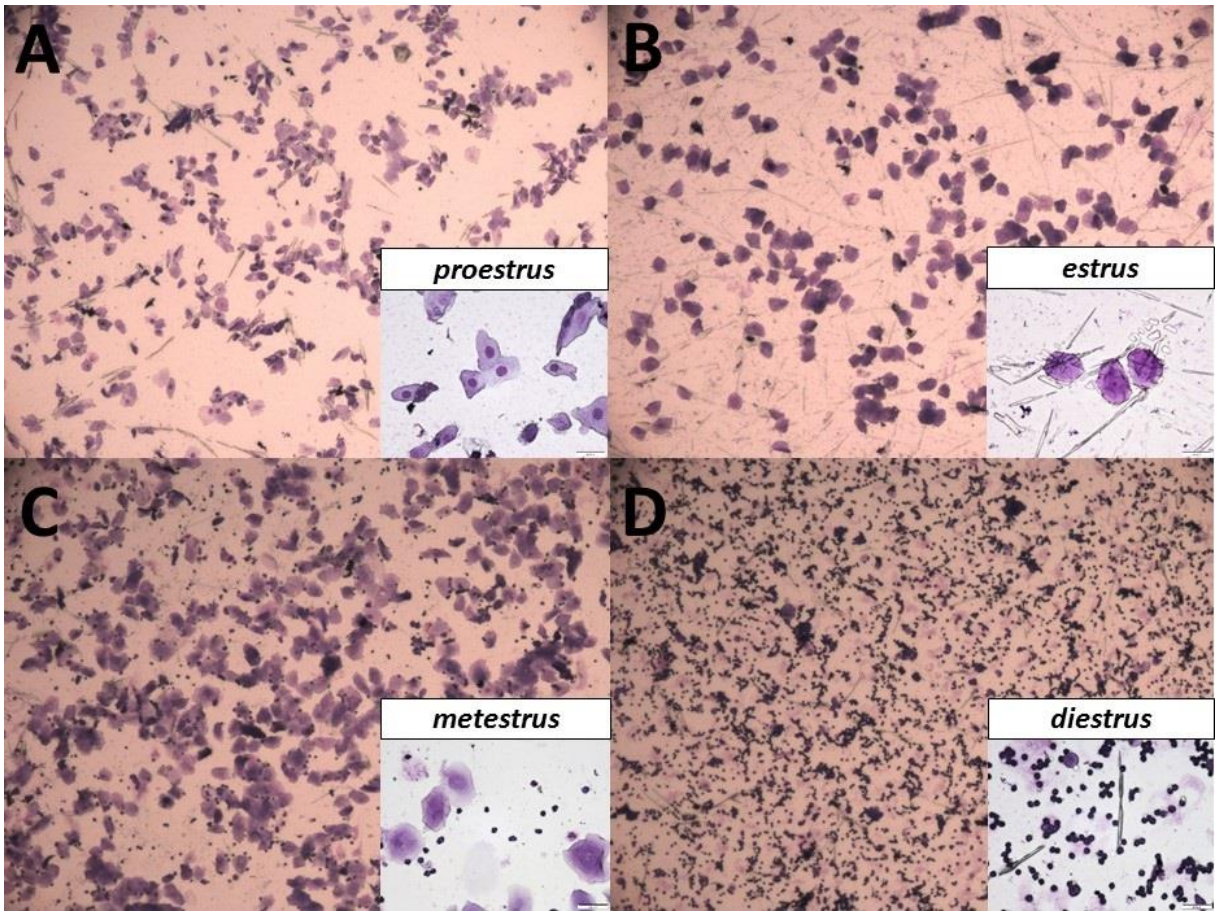
Preparaty poddano deparafinizacji, a następnie uwodnieniu w szeregu alkoholowym o malejącym stężeniu (jak opisano w podrozdziale 3.4.5.2.). Aby ułatwić dostęp przeciwciał do wnętrza komórek i ich wiązanie się z antygenem, zastosowano permeabilizację błon komórkowych z użyciem detergentu 0.3% Triton X-100 (T8787; Sigma Aldrich) przez okres 5 min. w temp. pokojowej. Celem odsłonięcia determinant antygenowych, preparaty gotowano w buforze cytrynianowym (10 mM, pH = 6) przez 40 min. w temp. 90^{o}C. Skrawki blokowano roztworem blokującym zawierającym 2% BSA, 0.3 M glicyny (G8898; Sigma Aldrich) w buforze PBST przez 2 godz. w temp. pokojowej. Ze względu na wysoką autofluorescencję tkanki jajnika myszy, konieczne było jej wyciszenie poprzez inkubację z 0.3% roztworem Sudan Black (199664, Sigma Aldrich) (w 70% etanolu) przez 10 min. w temp. pokojowej. Następnie preparaty płukano 8 razy po 5 min. w buforze PBST. W kolejnym etapie preparaty inkubowano z przeciwciałami króliczymi poliklonalnymi dla anty-NLRP3 (1:100, NBP2-12446; Novus Biologicals) przez całą noc w temp. 4^{o}C. Kontrole negatywne stanowiły skrawki inkubowane z przeciwciałami króliczymi poliklonalnymi dla anty-immunoglobuliny typu G (IgG, ab37415; Abcam) lub bez przeciwciał pierwszorzędowych. Następnego dnia, preparaty płukano 6 razy po 5 min. w buforze PBST w temp. pokojowej, po czym inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi oślimi anty-króliczymi IgG (H+L) skoniugowanymi z indokarbocyjaniną (Cy3) – AffiniPure (1:400, 711-165-152; Jackson ImmunoResearch) przez 2 godz. w temp. pokojowej. Skrawki płukano 6 razy po 5 min. w buforze PBST w temp. pokojowej. Celem wybarwienia jąder komórkowych, dodano DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol) (D9542-10MG; Sigma Aldrich) (rozcieńczony 1:100 w buforze PBS) i inkubowano przez okres 30 min. w temp. pokojowej. Preparaty

zamknięto z wykorzystaniem medium Vectashield (H-1000; Vector Laboratories) i przechowywano w temp. −20°C.

Zdjęcia preparatów wykonywano z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM 800) i obiektywem immersyjnym o 40-krotnym powiększeniu oraz aperturze numerycznej 1.2. Do analizy zdjęć użyto oprogramowania Zeiss ZEN 2.5 lite Microscope Software (Carl Zeiss, Germany).

3.4.6. Określenie fazy cyklu płciowego myszy

Fazy cyklu płciowego myszy monitorowano za pomocą badania cytologicznego z wypłuczyn pochwy z zastosowaniem zestawu Diff Quik® (Medion Diagnostics AG, Switzerland, DQ-ST). Przy użyciu pipety, wprowadzono 10 µl sterylnego PBS, następnie wypłuczyny nałożono na szkiełko podstawowe i dokonano rozmazu z użyciem szkiełka nakrywkowego. Po wyschnięciu, preparaty zanurzano kolejno przez 2 min. w metanolu, eozynie i błękicie metylenowym. Wyróżnia się trzy główne typy komórek w wymazach pochwowych: komórki nabłonkowe z widocznym jądrem, złuszczone komórki nabłonkowe oraz leukocyty. Komórki nabłonkowe z widocznym jądrem mają lekko zabarwioną cytoplazmę i owalne jądro. Złuszczające się komórki nabłonkowe o kształcie wielokątów są wybarwione jednolicie i nie posiadają jądra w środku. Wielojądrzaste leukocyty mogą być odróżnione od pozostałych komórek ze względu na mniejszy rozmiar i intensywniejsze zabarwienie (Kyrönlahti i in. 2011; McLean i in. 2012). Faza *proestrus* charakteryzuje się obecnością komórek nabłonkowych z widocznym jądrem (Rys. 9). Podczas fazy *estrus* obserwuje się gęsto upakowane skupiska złuszczających się komórek nabłonkowych. W kolejnej fazie *metestrus* dodatkowo pojawiają się silniej zabarwione leukocyty, które dominują w fazie *diestrus* (McLean i in. 2012). Analizę preparatów mikroskopowych przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego (Olympus CX31).



Rys. 9. Wybrane zdjęcia badań cytologicznych wymazów pochwowych w różnych fazach cyklu płciowego u myszy: A) *prostrus*; B) *estrus*; C) *metestrus*; D) *diestrus*.

3.4.7. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

Podczas trwania eksperymentów przyżyciowo monitorowano parametry takie jak waga, a także masa tkanki tłuszczowej i beztłuszczowej przy użyciu magnetycznego rezonansu jądrowego Minispec LF90 II (Bruker, Niemcy). Za pomocą tej metody możliwe jest określenie (przyżyciowo) zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie. W celu wykonania pomiaru myszy umieszczano w plastikowej tubie i unieruchamiano plastikowym tłokiem. Czas trwania pomiaru wynosił około 3 minuty.

3.5. Analiza bioinformatyczna

3.5.1. Analiza genów ulegających zróżnicowanej ekspresji

Jakość surowych danych oszacowano za pośrednictwem FASTQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Sekwencje o niskiej

jakości oraz sekwencje adapterów usunięto przy pomocy oprogramowania cutadapt (wersja 1.18) (Martin 2011). Następnie oczyszczone sekwencje mapowano na mysi genom referencyjny (GRCm39) przy użyciu oprogramowania STAR (wersja 2.7.10a) (Dobin i in. 2013). W kolejnym etapie ilość sekwencji wiążących się do poszczególnych genów (egzonów) obliczono za pomocą programu featureCounts (wersja 2.0.1) (Liao i in. 2014). Analizę genów ulegających zróżnicowanej ekspresji (ang. Differentially Expressed Genes - DEGs) i skorygowaną wartość p (ang. p-adjusted values) określono za pomocą oprogramowania statystycznego R (wersja 4.1.3) przy użyciu pakietu DESeq2 (wersja 1.34.0) (Love i in. 2014). Próg dla istotnie różnej ekspresji ustalono na p-skorygowany $\leq 0{,}05$. Wizualna prezentacja wyników została przeprowadzona w oprogramowaniu R z wykorzystaniem ggplot2 (wersja 3.3.6) (Wickham 2016), Venn Diagram (wersja 1.7.3) oraz pheatmap (wersja 3.1.1) (Gu 2022).

3.5.2. Analiza funkcjonalna

Analiza funkcjonalna pozwala na zbadanie przynależności genów do poszczególnych procesów biologicznych. Geny podzielono na trzy główne kategorie GO (ang. Gene Ontology terms): według funkcji produktu genu (ang. Molecular Function - MF), procesu biologicznego w jakim może brać udział (ang. Biological Process - BP), czy też lokalizacji komórkowej produktu genu (ang. Cellular Component - CC).

Analizę funkcjonalną DEGs przeprowadzono w oparciu o bazę danych Gene Ontology (GO) przy użyciu pakietów clusterProfiler (wersja 4.2.2) (Yu i in. 2012), DOSE (wersja 3.20.1) (Yu i in. 2015), biomaRt (wersja 2.50.3) (Durinck i in. 2009) i org.Mm.eg.db (wersja 3.14.0) za pomocą oprogramowania statystycznego R, z ustalonym kryterium P-skorygowane $\leq 0{,}05$. Wizualna prezentacja wyników została przygotowana przy użyciu oprogramowania R z ggplot2.

3.6. Analiza statystyczna wyników

Do oceny istotności różnic otrzymanych wyników użyto programu GraphPad Prism Software (Version 9.01, GraphPad Software, Inc.; La Jolla, USA). Sprawdzenie normalności rozkładu dokonywano z wykorzystaniem testu D'Agostino-Pearsona. Dla wyników o rozkładzie normalnym zastosowano test parametryczny T-studenta. Do testowania istotności różnic w grupach z niską liczebnością i brakiem rozkładu normalnego używano nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya (przy porównaniu dwóch grup niezależnych) oraz test kolejności par Wilcoxona (przy porównaniu zmiennych zależnych). Wartości przedstawiono jako średnie±SEM. Za poziom istotności przyjęto $p<0,05$.

W 1. zadaniu badawczym różnice statystyczne w ekspresji *Nlrp3, Casp1, Il-1β, Il-18* na poziomie mRNA w jajnikach określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Ponadto różnice statystyczne w ekspresji NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18 na poziomie białka w jajniku potwierdzono testem t-studenta lub nieparametrycznym testem Wilcoxona.

W 2. zadaniu badawczym różnice statystyczne w ekspresji *Nlrp3, Casp1, Il-1β, Il-18* na poziomie mRNA w jajniku określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Ponadto różnice statystyczne w ekspresji NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18 na poziomie białka w jajniku potwierdzono testem t-studenta lub nieparametrycznym testem Wilcoxona. Poza tym różnice statystyczne w stężeniu IL-1β wykazano nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya. Różnice statystyczne pomiędzy wartościami uzyskanymi z pomiarów przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (masy ciała, masy tkanki tłuszczowej i beztłuszczowej oraz wskaźnika otłuszczenia) myszy eksperymentalnych określono na podstawie nieparametrycznego testu wielokrotnych porównań przy użyciu metody Bonferoniego-Sidaka.

W 3. zadaniu badawczym analizę DEGs oraz analizę funkcjonalną wykonano w oprogramowaniu statystycznym R (szczegóły opisano w podrozdziale 3.5).

W 4. zadaniu badawczym zastosowano korelację cząstkową celem określenia koekspresji genów ($cor > 0.9$) z wykorzystaniem pakietu corpcor (wersja: 1.6.10). Statystykę sieci obliczono przy użyciu pakietu igraph (wersja 1.4.3).

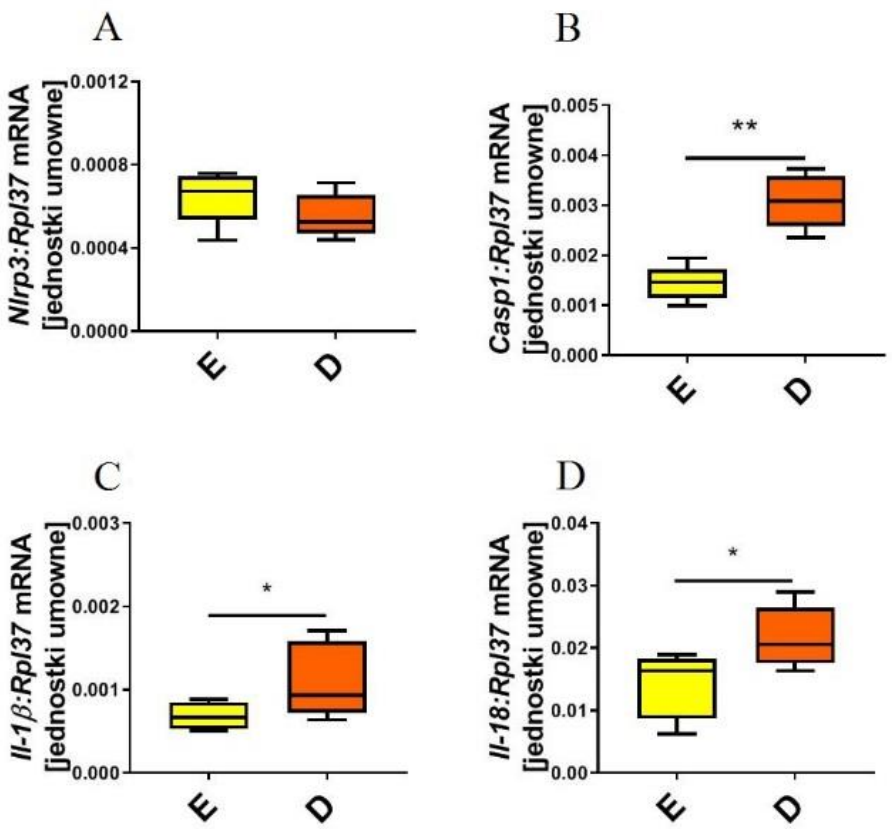
W 5. zadaniu badawczym różnice statystyczne w ekspresji *Nlrp3, Casp1, Il-1β, Il*-18 na poziomie mRNA w wątrobie określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Ponadto różnice statystyczne w ekspresji NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18 na poziomie białka w wątrobie potwierdzono testem t-studenta lub nieparametrycznym testem Wilcoxona. Poza tym różnice statystyczne w stężeniu IL-1β wykazano nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya.

4. WYNIKI

4.1. Zadanie badawcze 1. Określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy

Rysunek 10 przedstawia ekspresję *Nlpr3, Casp1, Il-1β* i *Il-18* na poziomie mRNA w jajnikach myszy w fazach *estrus* i *diestrus*.

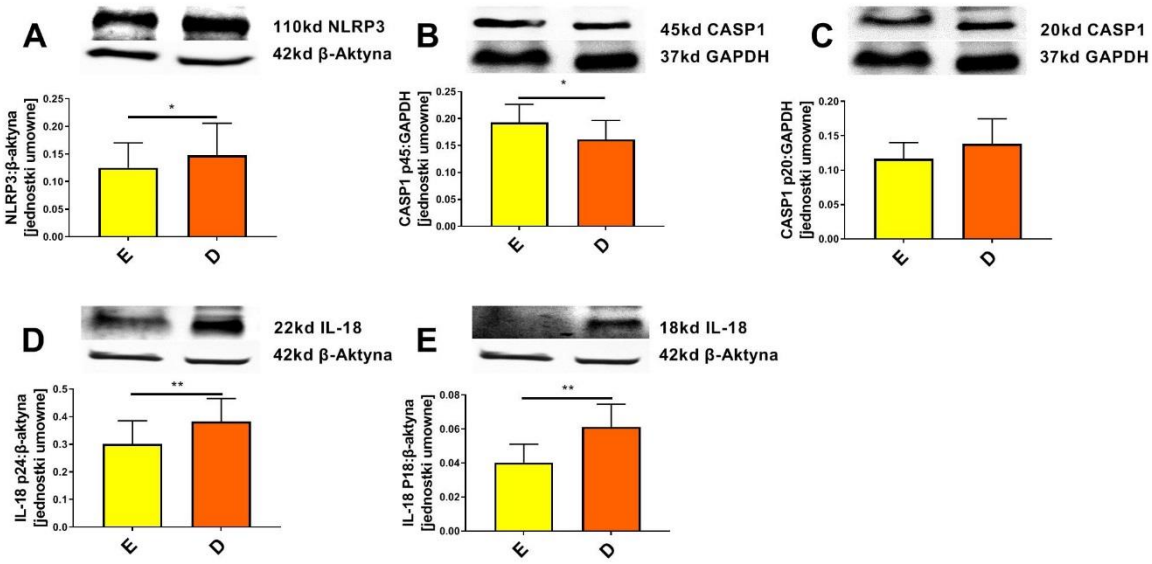
W fazie *diestrus* wykazano wzrost ekspresji *Casp1* (Rys. 10B; p<0,01), *Il-1β* i *Il-18* (Rys. 10C, D; p<0,05) w jajniku myszy.



Rys. 10. Ekspresja A) NOD-like receptor protein 3 (*Nlrp3*), B) kaspazy 1 (*Casp1*), C) interleukiny 1β (*Il-1β*), D) interleukiny 18 (*Il-18*) na poziomie mRNA w jajnikach myszy w fazach *estrus* i *diestrus*. Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Liczba wykorzystanych prób do analizy Real-time PCR: n=6-7. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (*p<0,05; **p<0,01).

Rysunek 11 przedstawia ekspresję NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18 na poziomie białka w jajnikach myszy w fazach *estrus* i *diestrus*.

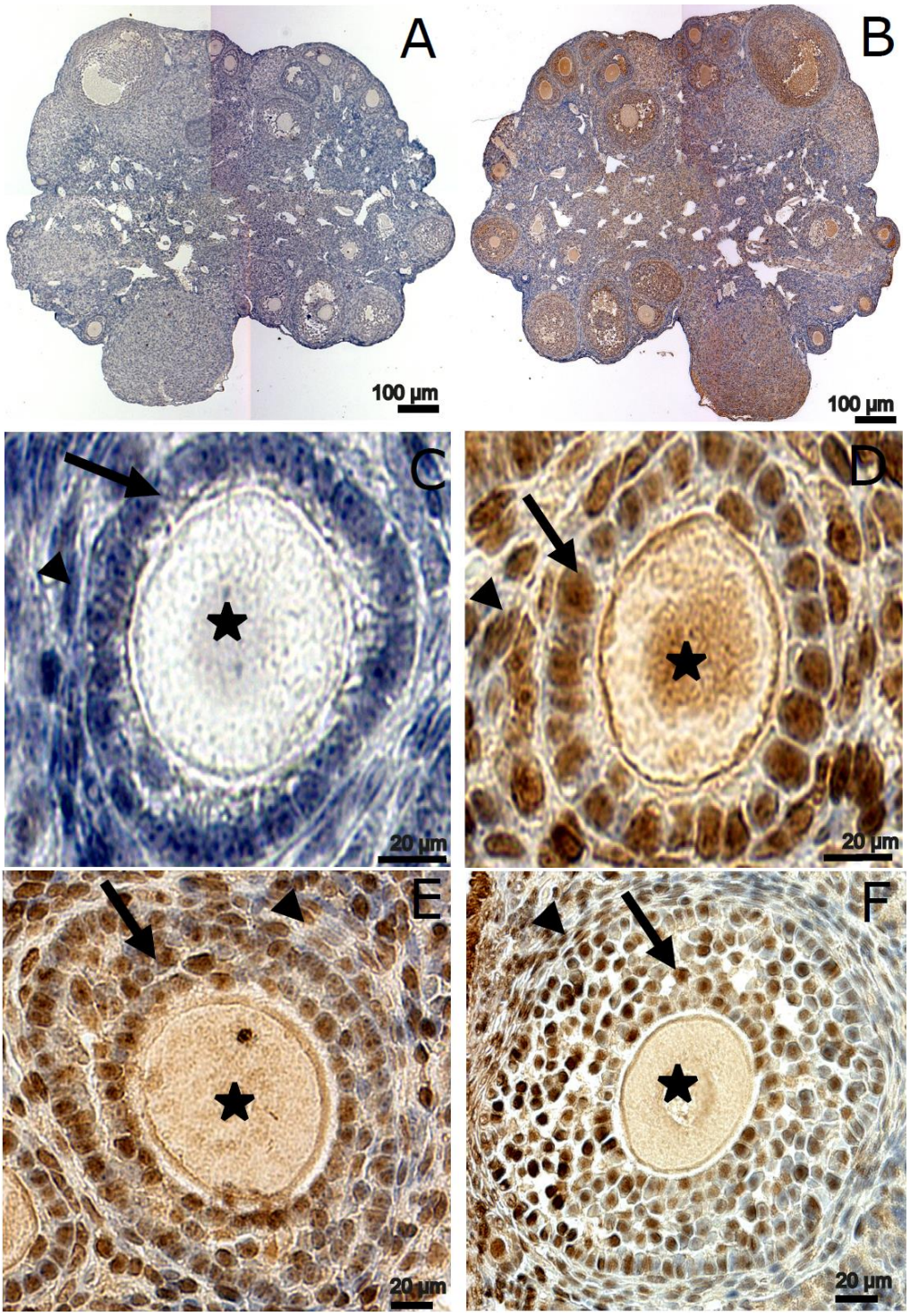
W fazie *diestrus* wykazano wzrost ekspresji NLRP3 (Rys. 11A; $p<0,05$), IL-18 p24, IL-18 p18 (Rys. 11D, E; $p<0,01$) na poziomie białka w jajniku myszy. Dodatkowo wykazano obniżenie ekspresji CASP1 p45 (Rys. 11B; $p<0,05$) na poziomie białka w jajniku myszy w fazie *diestrus*.



Rys. 11. Ekspresja A) NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), B) pro-kaspazy 1 (CASP1 p45), C) kaspazy 1 podjednostki p20 (CASP1 p20), D) interleukiny-18 podjednostki p24 (IL-18 p24), E) interleukiny 18 podjednostki p18 (IL-18 p18) na poziomie białka w jajnikach myszy w fazach *estrus* i *diestrus*. Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Liczba wykorzystanych prób do analizy Western blotting: n=7-8/grupę. E – faza *estrus*, D – faza *diestrus*. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (*$p<0,05$; **$p<0,01$).

Rysunek 12 przedstawia immunolokalizację NLRP3 w jajniku myszy w fazie *diestrus*.

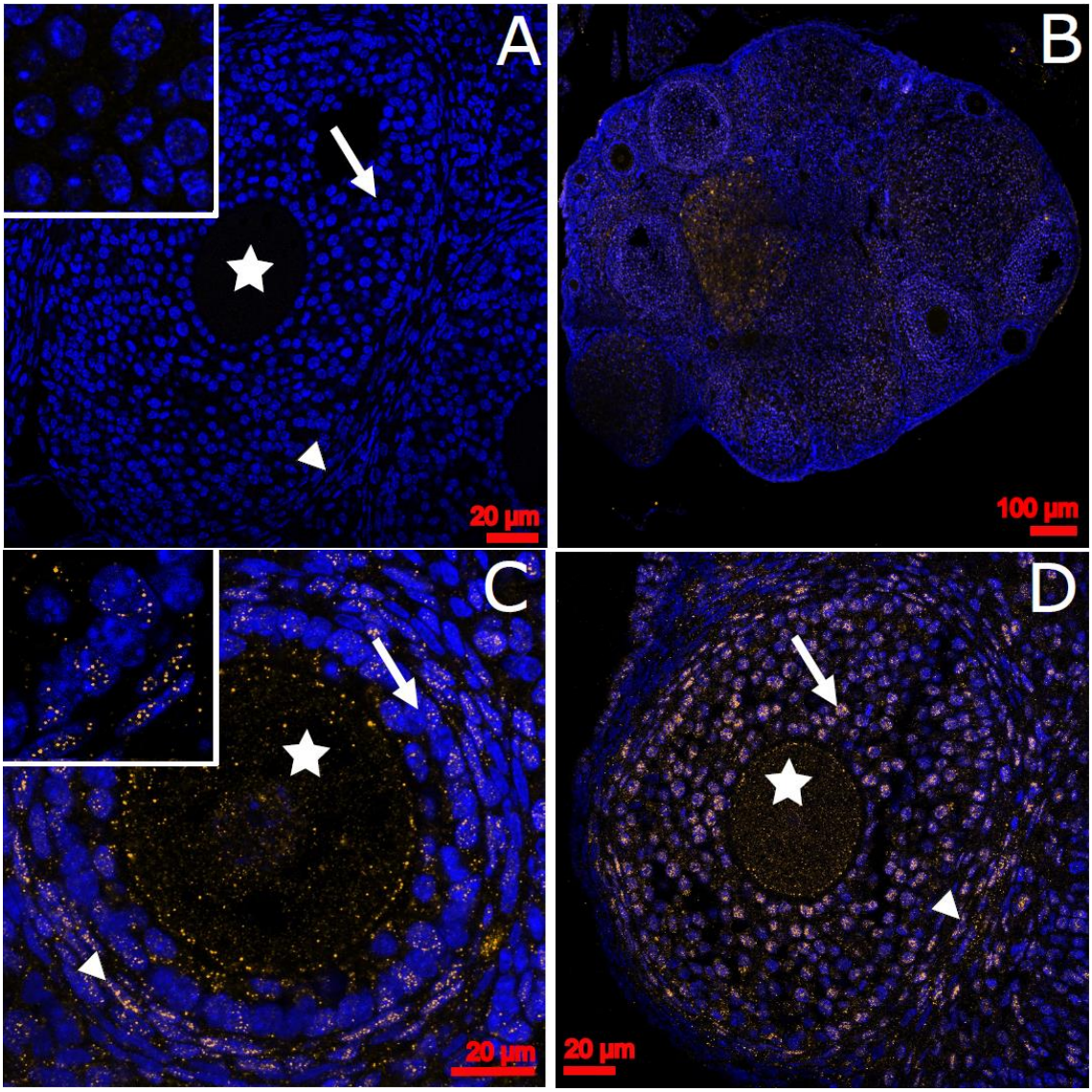
Immunolokalizację NLRP3 potwierdzono metodą IHC w pęcherzykach jajnikowych, CL oraz zrębie jajnika (Rys. 12B). Stwierdzono większą ekspresję w GCs, TCs oraz oocytach we wszystkich etapach rozwoju pęcherzyków (Rys. 12D-F).



Rys. 12. Wybrane zdjęcia przedstawiające immunolokalizację NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) podczas wzrostu pęcherzyków w jajniku myszy. Brązowe zabarwienie wskazuje na lokalizację NLRP3 w jajniku myszy. Jądra komórkowe wybarwiono hematoksyliną (niebieskie zabarwienie). Barwienie kontrolne przeprowadzono bez użycia przeciwciał pierwszorzędowych (A, C). Lokalizacja NLRP3 w jajniku (B), pęcherzyku pierwszorzędowym (D), drugorzędowym (E) oraz przedantralnym (F) przy użyciu metody immunohistochemicznej. Strzałki - komórki ziarniste, końcówki strzałki – komórki osłonki, gwiazdki – oocyty. Skala: 20 µm i 100 µm.

Rysunek 13 przedstawia immunolokalizację NLRP3 w jajniku myszy w fazie *diestrus*.

Immunolokalizację NLRP3 potwierdzono metodą IF w pęcherzykach jajnikowych, CL oraz zrębie jajnika (Rys. 13B). Stwierdzono większą ekspresję w GCs, TCs oraz oocytach (Rys. 13C-D).

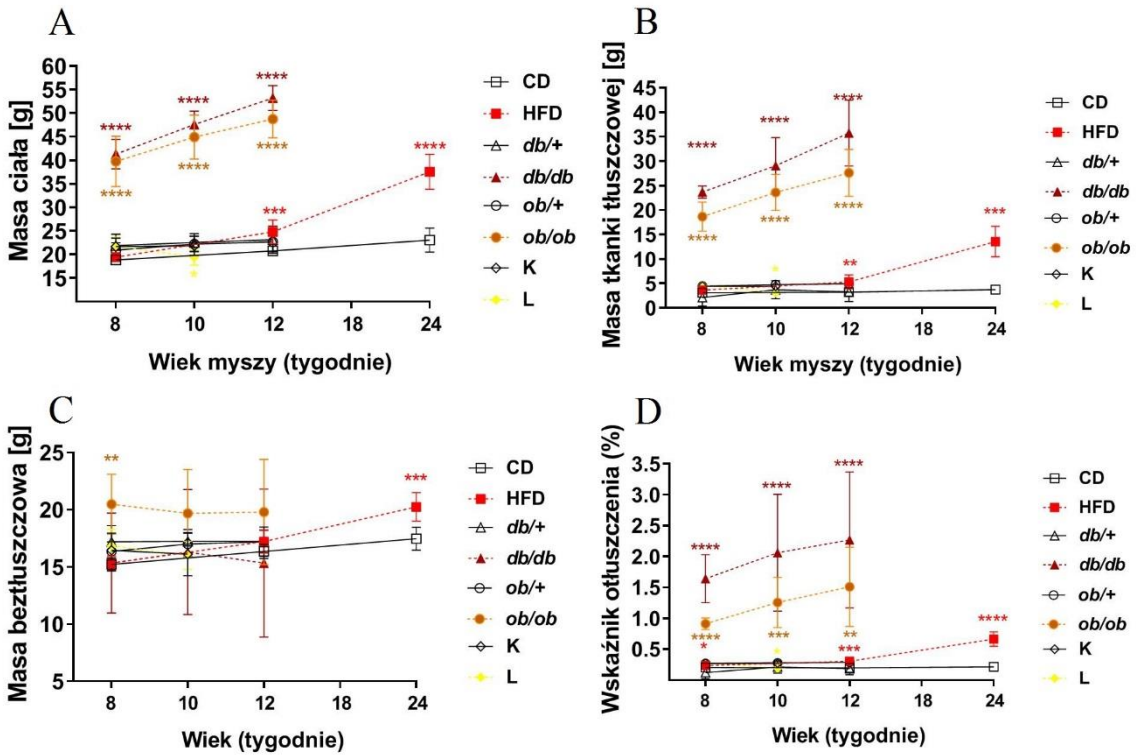


Rys. 13. Wybrane zdjęcia przedstawiające immunolokalizację NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) w jajniku myszy. Pomarańczowe zabarwienie wskazuje na lokalizację NLRP3 w jajniku myszy. Jądra komórkowe wybarwiono DAPI (niebieskie zabarwienie). Barwienie kontrolne przeprowadzono bez użycia przeciwciał pierwszorzędowych (A). Lokalizacja NLRP3 w jajniku jajniku (B), pęcherzyku drugorzędowym (C) oraz przedantralnym (D) przy użyciu metody immunofluorescencyjnej. Zdjęcia w lewym górnym rogu (A, C) – powiększenie komórek ziarnistych. Strzałki - komórki ziarniste, końcówki strzałki – komórki osłonki, gwiazdki – oocyty. Skala: 20 µm i 100 µm.

4.2 Zadanie badawcze 2. Określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy

Rysunek 14 przedstawia charakterystykę fenotypu myszy w modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Zestawienie wszystkich dokonanych pomiarów (masa ciała, masa tkanki tłuszczowej, masa tkanki beztłuszczowej i wskaźnik otłuszczenia) przedstawiono w tabelach S1A-D (Suplementy: Tabele S1A-D).

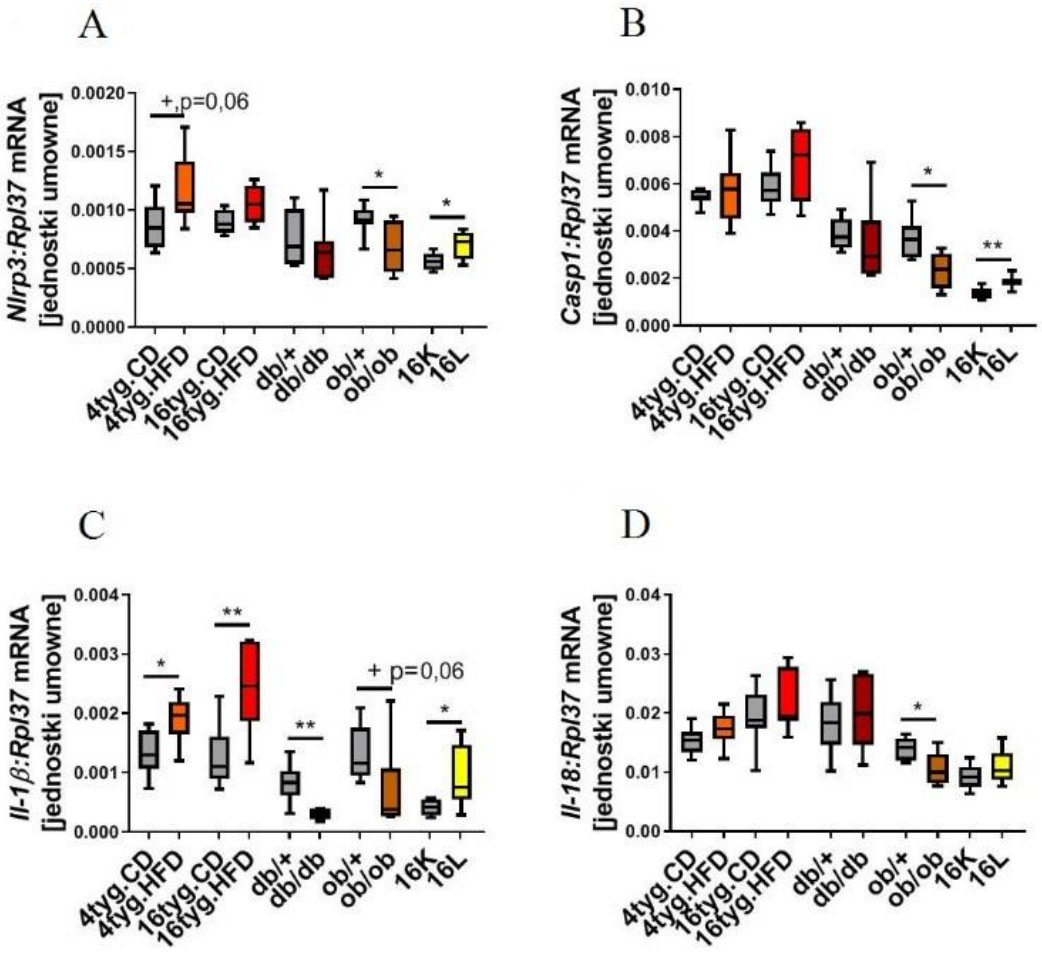
Masa ciała myszy *db/db* i *ob/ob* wynosiła około 40 gram (g), natomiast myszy kontrolnych około 20 g (Rys. 14A). Zarówno myszy *db/db* i *ob/ob* były znacznie grubsze w wieku 12 tyg., ze średnią masą ciała 53 g u myszy *db/db* i 49 g u myszy *ob/ob* (Rys. 14A; $p<0,05$), natomiast średnia waga myszy karmionych HFD w 24 tyg. życia wynosiła 33 g (Rys. 14A; $p<0,05$). Waga ciała myszy, którym podawano leptynę (L) pomiędzy 8 a 10 tyg. życia obniżyła się z 20 g do 17 g (Rys. 14A; $p<0,05$). Masa tkanki tłuszczowej u obu szczepów myszy *db/db* i *ob/ob* zwiększyła się w okresie od 8 do 12 tyg. życia o około 11 g i była odpowiednio większa o 32 g u myszy *db/db* i 23 g u myszy *ob/ob* w porównaniu do myszy kontrolnych (Rys. 14B; $p<0,001$). Masa tkanki tłuszczowej w grupie myszy karmionych HFD znacząco zwiększyła się w 12 tyg. i była o 9 g większa w 24 tyg. życia (Rys. 14B; $p < 0,01$), natomiast u myszy L była niższa w 10 tyg. życia (Rys. 14B; $p<0,05$). Masa beztłuszczowa u myszy *db/db* była mniejsza o 2 g, natomiast u myszy *ob/ob* była większa o 4 g od początku eksperymentu i utrzymywała się aż do 12 tyg. życia (Rys. 14C; $p<0,05$). Masa beztłuszczowa w grupie myszy karmionych HFD zwiększyła się o 3 g w okresie od 8 tyg. do 24 tyg. życia w porównaniu do myszy kontrolnych (Rys. 14C; $p<0,01$). Wskaźnik otyłości u obu szczepów myszy *db/db* i *ob/ob* zwiększył się w okresie od 8 do 12 tyg. życia o około 0,5% i była odpowiednio większa o 0,94 % u myszy *db/db* i 0,16 g u myszy *ob/ob* w porównaniu do myszy kontrolnych (Rys. 14D; $p<0,05$). Wskaźnik otyłości w grupie myszy karmionych HFD zwiększył się o 1,17% (Rys. 14D; $p<0,05$), natomiast u myszy L zmniejszył się o 0,06% w porównaniu do grupy kontrolnej (Rys. 14D; $p<0,05$).



Rys. 14. Charakterystyka fenotypu myszy modelu otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii**.** Mierzone parametry: A) masa ciała, B) masa tkanki tłuszczowej, C) masa beztłuszczowa, D) wskaźnik otłuszczenia przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Model DIO: myszy szczepu B6 karmione dietą standardową (ang. chow diet, CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD). Otyłość uwarunkowana 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 (L) lub sól fizjologiczną (K). W modelu DIO pomiary przeprowadzono w 8, 12 i 24 tygodniu życia. W modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie pomiary przeprowadzono w 8, 10 i 12 tygodniu życia, natomiast w modelu farmakologicznej hiperleptynemii w 8 i 10 tygodniu życia. HFD – kropka czerwona, myszy *db/db* – kropka brązowa, myszy *ob/ob* – kropka pomarańczowa, L – kropka żółta. Kropki czarne wskazują grupy kontrolne. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; ***$p<0,001$; $p<0,0001$).

Rysunek 15 przedstawia ekspresję *Nlpr3, Casp1, Il-1β* i *Il-18* na poziomie mRNA w jajnikach myszy modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

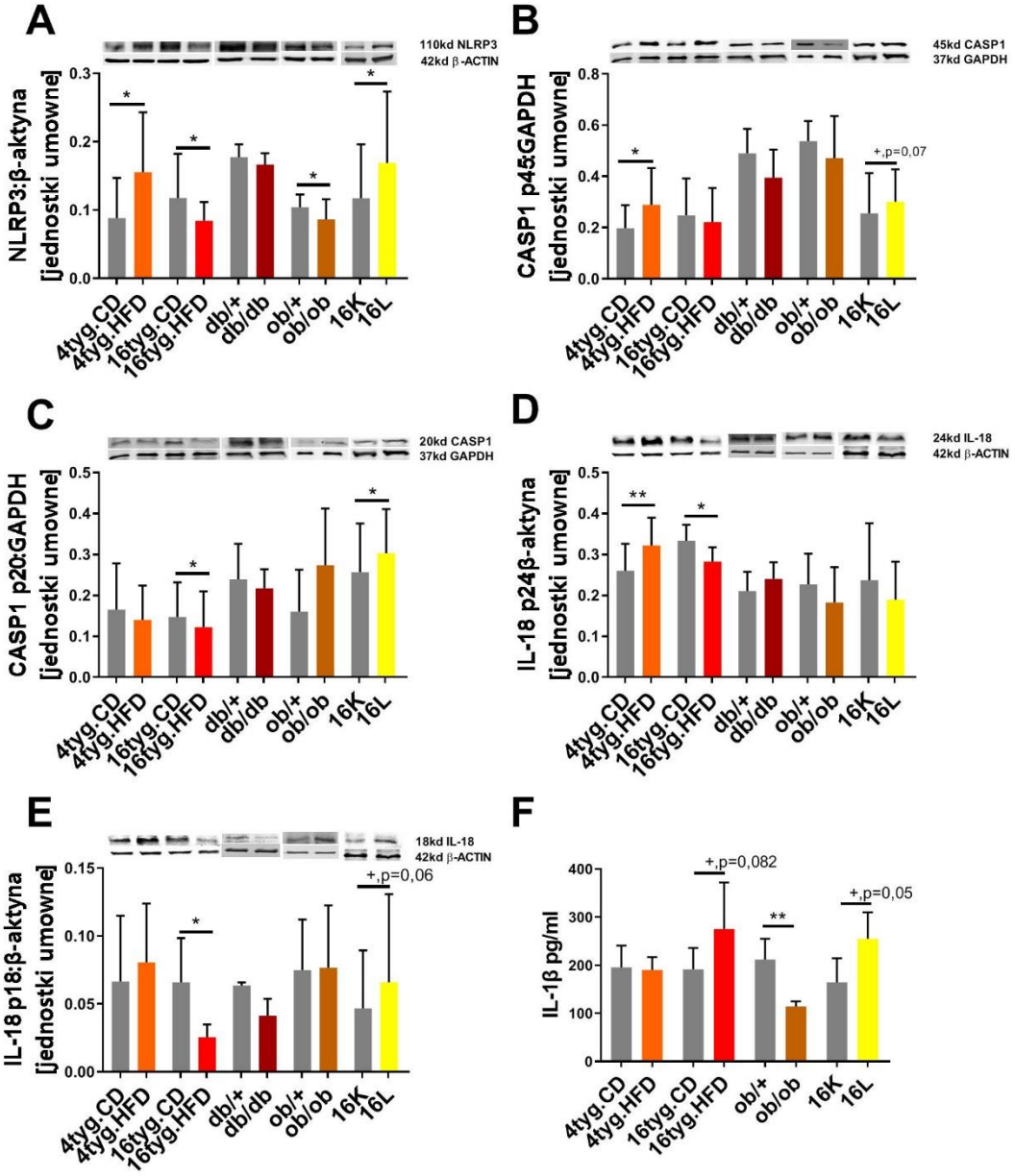
W jajniku myszy 4 tyg. HFD wykazano wzrost ekspresji *Nlrp3* (Rys. 15A; p=0,06), natomiast w grupie myszy 4 tyg. HFD oraz 16 tyg. HFD wykazano wzrost ekspresji *Il-1β* (Rys. 15C, odpowiednio p<0,05; p<0,01). Ponadto wykazano obniżenie ekspresji *Il-1β* w jajniku myszy *db/db* (Rys. 15C; p<0,01). Natomiast u myszy *ob/ob* wykazano obniżenie ekspresji *Nlrp3* (Rys. 15A; p<0,05), *Casp1* (Rys. 15B; p<0,05), *Il-18* (Rys. 15D; p<0,05). Co więcej w jajniku myszy 16L wykazano zwiększoną ekspresję *Nlrp3* (Rys. 15A; p<0,05), *Casp1* (Rys. 15B; p<0,01) oraz *Il-1β* (Rys. 15C; p<0,05).



Rys. 15. Ekspresja A) NOD-like receptor protein 3 (*Nlrp3*), B) kaspazy 1 (*Casp1*), C) interleukiny 1β (*Il-1β*), D) interleukiny 18 (*Il-18*) na poziomie mRNA w jajniku myszy modelu otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Model DIO: myszy szczepu B6 karmione przez okres 4 tygodni dietą standardową (ang. chow diet, CD, 4 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD, 4 tyg. HFD) oraz 16 tygodni dietą standardową (16 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (16 tyg. HFD). Otyłość uwarunkowana 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). Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Liczba wykorzystanych prób do analizy Real-time PCR: n=6-8. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (*p<0,05; **p<0,01; +p=0,06).

Rysunek 16 przedstawia ekspresję NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18 na poziomie białka w jajnikach myszy modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii, a także stężenie IL-1β na poziomie białka w jajnikach myszy modelu DIO, myszy *ob/ob* oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

W jajniku myszy 4 tyg. HFD wykazano wzrost ekspresji NLRP3 (Rys. 16A; $p<0,05$), CASP1 p45 (Rys. 16B; $p<0,05$), IL-18 p24 (Rys. 16D; $p<0,01$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto wykazano obniżenie ekspresji NLRP3 (Rys. 16A; $p<0,05$), CASP1 p20 (Rys. 16C; $p<0,05$), IL-18 p24 (Rys. 16D; $p<0,05$) i IL-18 p18 (Rys. 16E; $p<0,05$) w grupie myszy 16 tyg. HFD. Dodatkowo metodą immunoenzymatyczną wykazano podwyższone stężenie IL-1β (Rys. 16F; $p=0,082$) w jajniku myszy 16 tyg. HFD. Nie wykazano zmian w ekspresji badanych białek w grupie myszy *db/db*. Natomiast u myszy *ob/ob* wykazano obniżenie ekspresji NLRP3 (Rys. 16A; $p<0,05$) oraz stężenia IL-1β (Rys. 16F; $p<0,01$). Dodatkowo w jajniku myszy 16L wykazano wzrost ekspresji NLRP3 (Rys. 16A; $p<0,05$) i CASP1 p20 (Rys.6C; $p<0,05$) oraz podwyższony poziom ekspresji CASP1 p45 (Rys. 16B; $p=0,07$), IL-18 p 18 (Rys. 16E; $p=0,06$) i stężenia IL-1β (Rys. 16F; $p=0,05$).

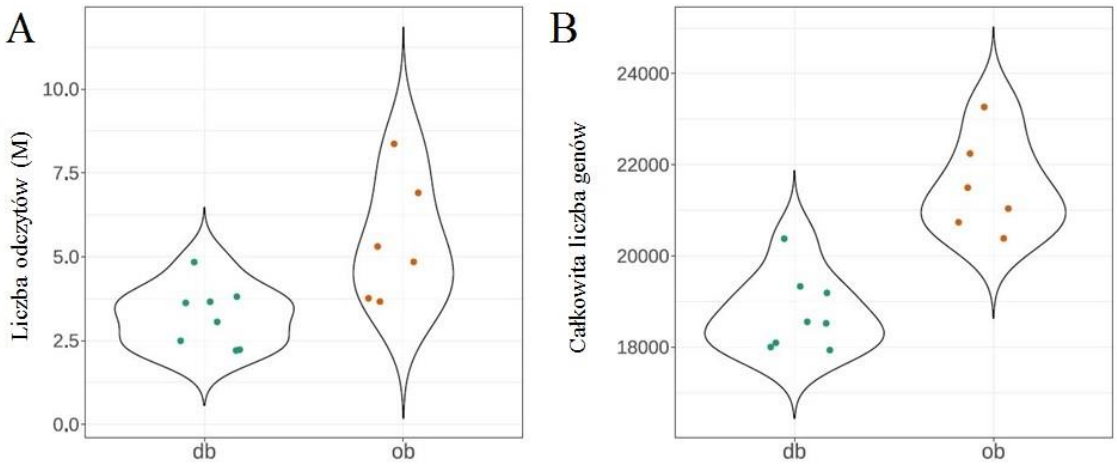


Rys. 16. Ekspresja A) NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), B) pro-kaspazy 1 (CASP1 p45), C) kaspazy 1 podjednostki p20 (CASP1 p20), D) interleukiny-18 podjednostki p24 (IL-18 p24), E) interleukiny 18 podjednostki p18 (IL-18 p18) na poziomie białka w jajniku myszy modelu otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Stężenie F) interleukiny 1β (IL-1β) w jajniku myszy modelu DIO, myszy *ob/ob* oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Model DIO: myszy szczepu B6 karmione przez okres 4 tygodni dietą standardową (ang. chow diet, CD, 4 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD, 4 tyg. HFD) oraz 16 tygodni dietą standardową (16 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (16 tyg. HFD). Otyłość uwarunkowana 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). Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie testu t-studenta i nieparametrycznego testu Wilcoxona dla analizy Western blotting oraz nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya dla metody immunoenzymatycznej. Liczba wykorzystanych prób do analizy Western blotting: n=6-8, metody immunoenzymatycznej: n=4-6. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (*p<0,05; **p<0,01; +p=0,07; p=0,06; p=0,05).

4.3. Zadanie badawcze 3. Analiza transkryptomiczna komórek ziarnistych myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob*

Rysunek 17 przedstawia liczbę odczytów oraz całkowitą liczbę genów ulegających ekspresji w GCs modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*).

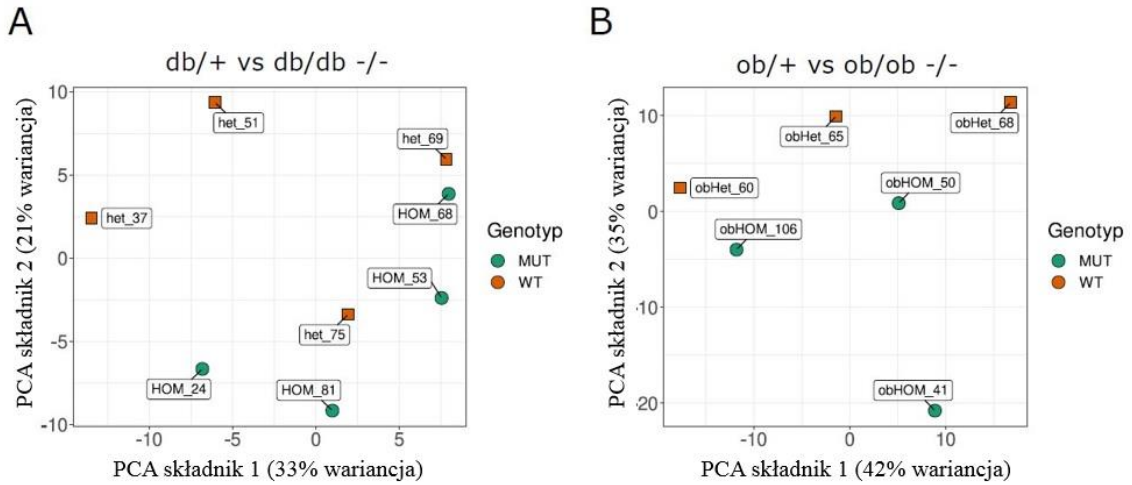
Na podstawie RNA-seq uzyskano 92,77 mln surowych odczytów w zakresie od 3,59 mln do 12,98 mln na każdą próbę. Po usunięciu sekwencji o niskiej jakości oraz sekwencji adapterów pozostało 92,66 mln wysokiej jakości odczytów (w zakresie 3,58 mln do 12,96 mln na każdą próbę), a następnie oczyszczone sekwencje mapowano na mysi genom referencyjny (GRCm39) z przypisaną liczbą odczytów w zakresie od 3,41 mln do 12,45 mln na każdą próbę (Rys. 17A). Średnio 87,5% odczytów zostało zmapowanych do genomu referencyjnego w unikatowych lokalizacjach. Całkowita liczba genów ulegających ekspresji w GCs myszy *db/db* i *ob/ob* wahała się w granicach od 17 934 do 23 270 (Rys. 17B, Suplementy: Tabela S2).



Rys. 17. Wykres skrzypcowy obrazujący A) liczbę odczytów oraz B) całkowitą liczbę genów w komórkach ziarnistych modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) na podstawie analizy RNA-seq. Otyłość uwarunkowana genetycznie: myszy pozbawione genu receptora leptyny (*db/db*) i grupa myszy kontrolnych (*db/+*); myszy pozbawione genu leptyny (*ob/ob*) i grupa myszy kontrolnych (*ob/+*). Każda pojedyncza kropka na wykresie skrzypcowym wskazuje badaną próbę: myszy *db/db* n=8; myszy *ob/ob* n=6. M - milion

Rysunek 18 przedstawia analizę głównych składowych (ang. Principal Component Analysis - PCA) globalnej ekspresji genów GCs modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*).

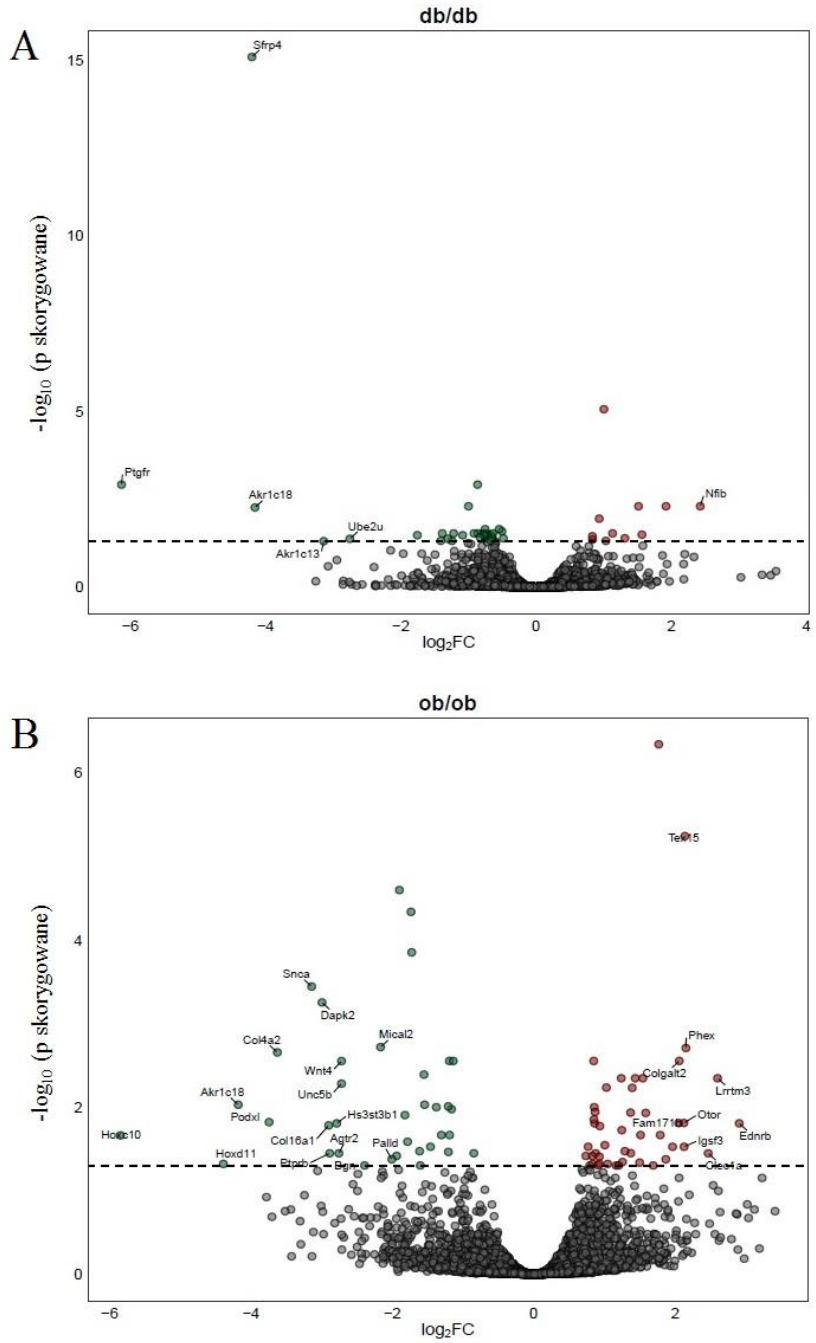
Przeprowadzona analiza nie wykazała wyraźnych różnic w profilu globalnej ekspresji genów GCs pomiędzy próbami myszy szczepu *db/db* (Rys. 18A) oraz myszy szczepu *ob/ob* (Rys. 18B) a próbami kontrolnymi, bez tendencji do klasteryzacji (tworzenia skupień).



Rys. 18. Analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis - PCA) prezentująca ekspresję genów komórek ziarnistych modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) na podstawie analizy RNA-seq. Otyłość uwarunkowana genetycznie: myszy pozbawione genu receptora leptyny (*db/db*) i grupa myszy kontrolnych (*db/+*); myszy pozbawione genu leptyny (*ob/ob*) i grupa myszy kontrolnych (*ob/+*). MUT – myszy homozygotyczne, WT – myszy heterozygotyczne.

Rysunek 19 przedstawia wykres wulkaniczy (ang. Volcano plot) DEGs w GCs modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*).

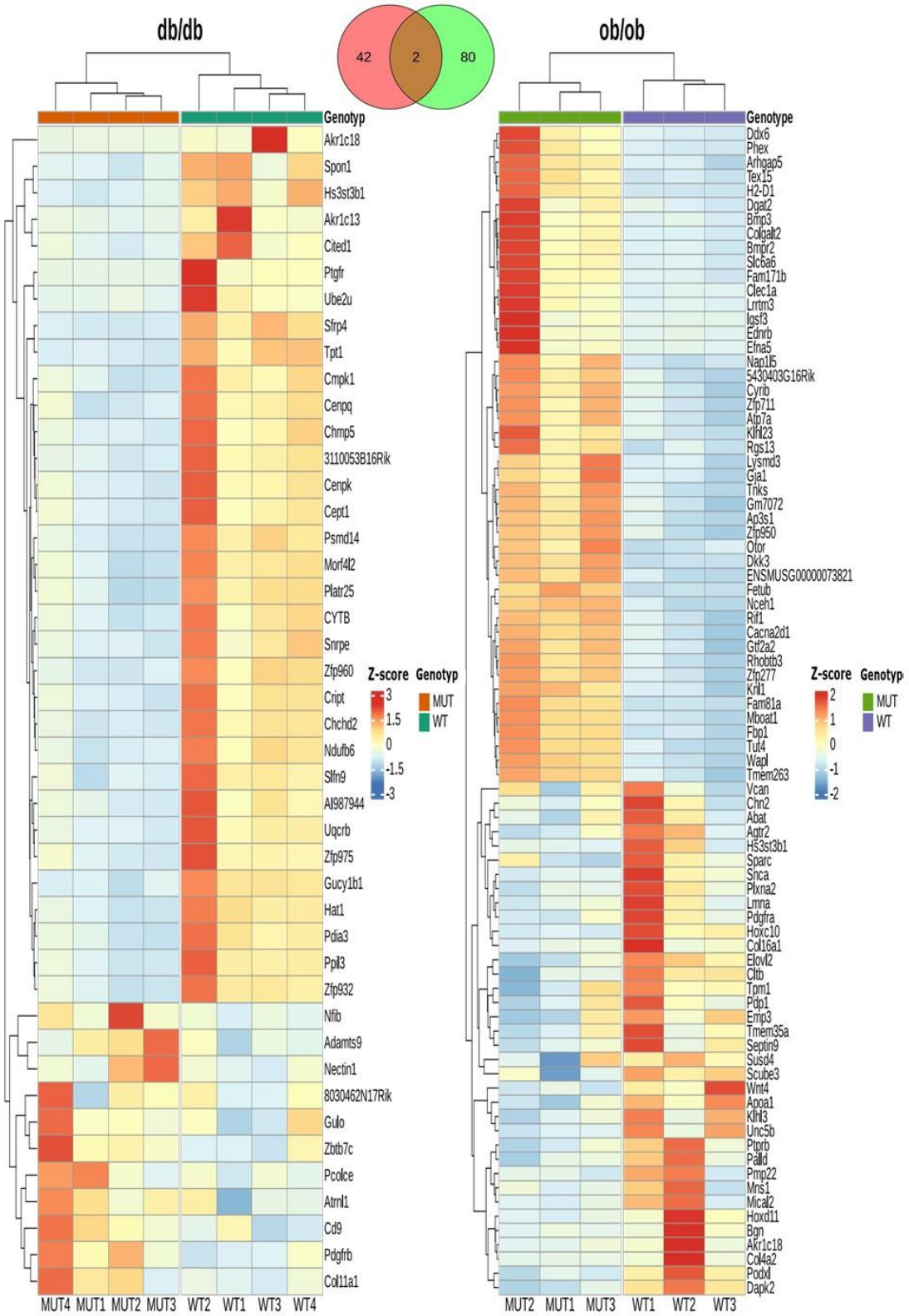
Przy użyciu wykresu wulkanicznego uwidoczniono różnice w ekspresji genów w GCs myszy *db/db* (Rys. 19A) oraz myszy *ob/ob* (Rys. 19B).



Rys. 19. Wykres wulkaniczny przedstawiający geny ulegające różnicowej ekspresji w komórkach ziarnistych modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie: A) myszy *db/db* oraz B) myszy *ob/ob*. Otyłość uwarunkowana genetycznie: myszy pozbawione genu receptora leptyny (*db/db*) i grupa myszy kontrolnych (*db/+*); myszy pozbawione genu leptyny (*ob/ob*) i grupa myszy kontrolnych (*ob/+*). Czerwone kropki oznaczają geny, których poziom ekspresji wzrósł. Zielone kropki oznaczają geny, których poziom ekspresji obniżył się. Oś x przedstawia krotność zmiany ekspresji (log_2FC – ang. log_2 fold change) pomiędzy transkryptomami grupy badanej a grupy kontrolnej, natomiast oś y przedstawia skorygowaną wartość p.

Rysunek 20 przedstawia DEGs w GCs modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*).

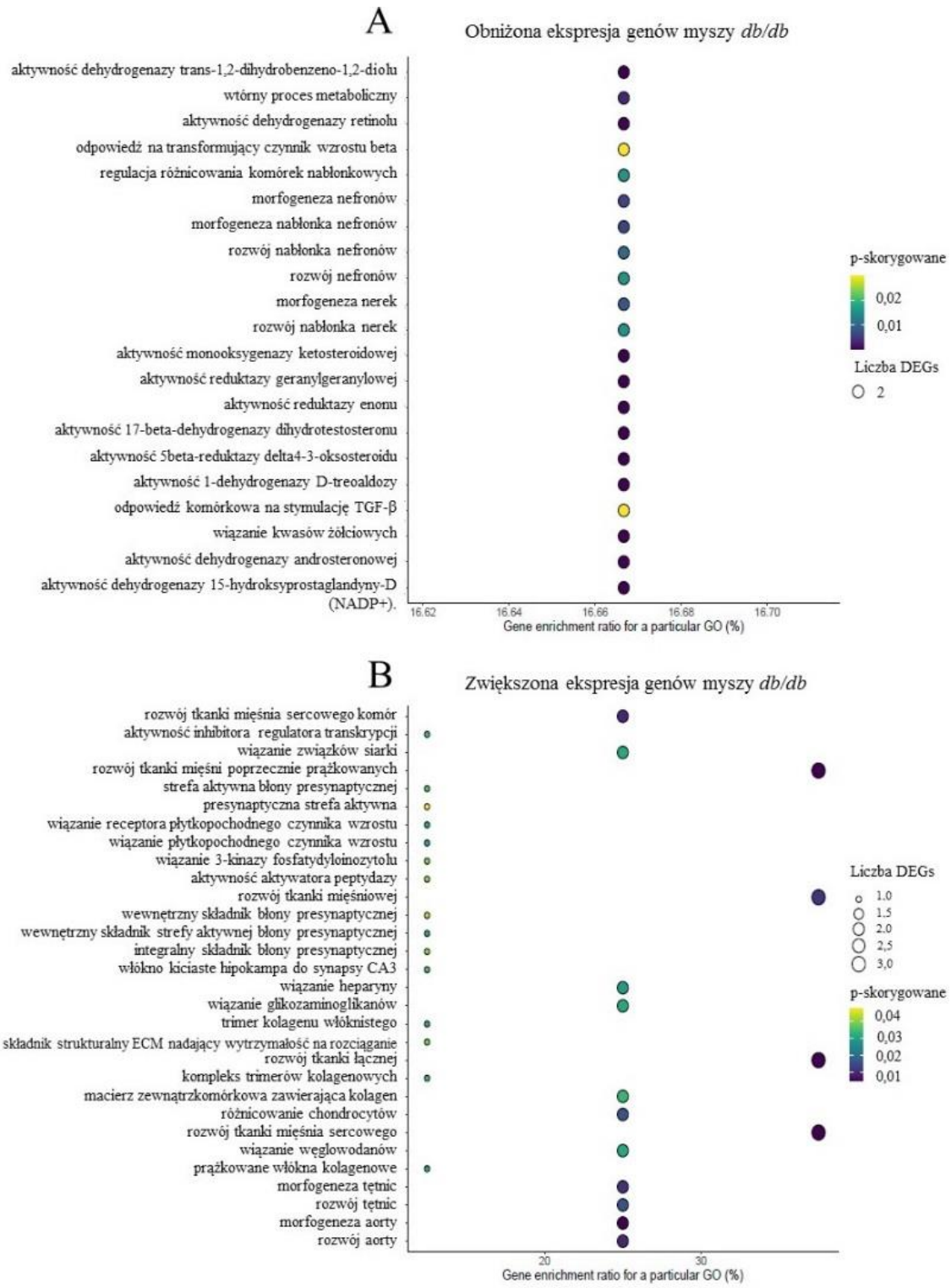
U myszy *db/db* wykazano 44 DEGs, z czego 11 genów wykazało wzrost poziomu ekspresji a 33 geny obniżoną ekspresję (Rys. 20, Suplementy: Tabela S3). Natomiast u myszy *ob/ob* wykazano 82 DEGs, z czego 46 genów wykazało wzrost poziomu ekspresji a 36 genów obniżoną ekspresję (Rys. 20, Suplementy: Tabela S4). Wśród wszystkich DEGs dla obu modeli tylko dwa geny wykazały obniżony profil ekspresji: siarczan 3-O- sulfotransferazy heparanu (*Hs3st3b1*) oraz aldo-keto reduktaza 1C18 (*Akr1c18*) (Rys. 20).



Rys. 20. Mapy cieplne przedstawiające geny o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji zidentyfikowanych w komórkach ziarnistych modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*). Mapa cieplna po lewej stronie rysunku przedstawia profil ekspresji genów u myszy szczepu *db/db*. Mapa cieplna po prawej stronie rysunku przestawia profil ekspresji genów u myszy szczepu *ob/ob*. W górnej części rysunku znajduje się diagram Venna przestawiający liczbę genów ulegających różnicowej ekspresji w badanych grupach. Wartość ekspresji przeskalowano do wartości skali Z (Z-score). Wysoką wartość ekspresji genu oznaczono kolorem czerwonym, a niską wartość ekspresji genu oznaczono kolorem niebieskim. MUT – myszy homozygotyczne, WT – myszy heterozygotyczne.

Rysunek 21 przedstawia analizę funkcjonalną DEGs w GCs myszy *db/db*.

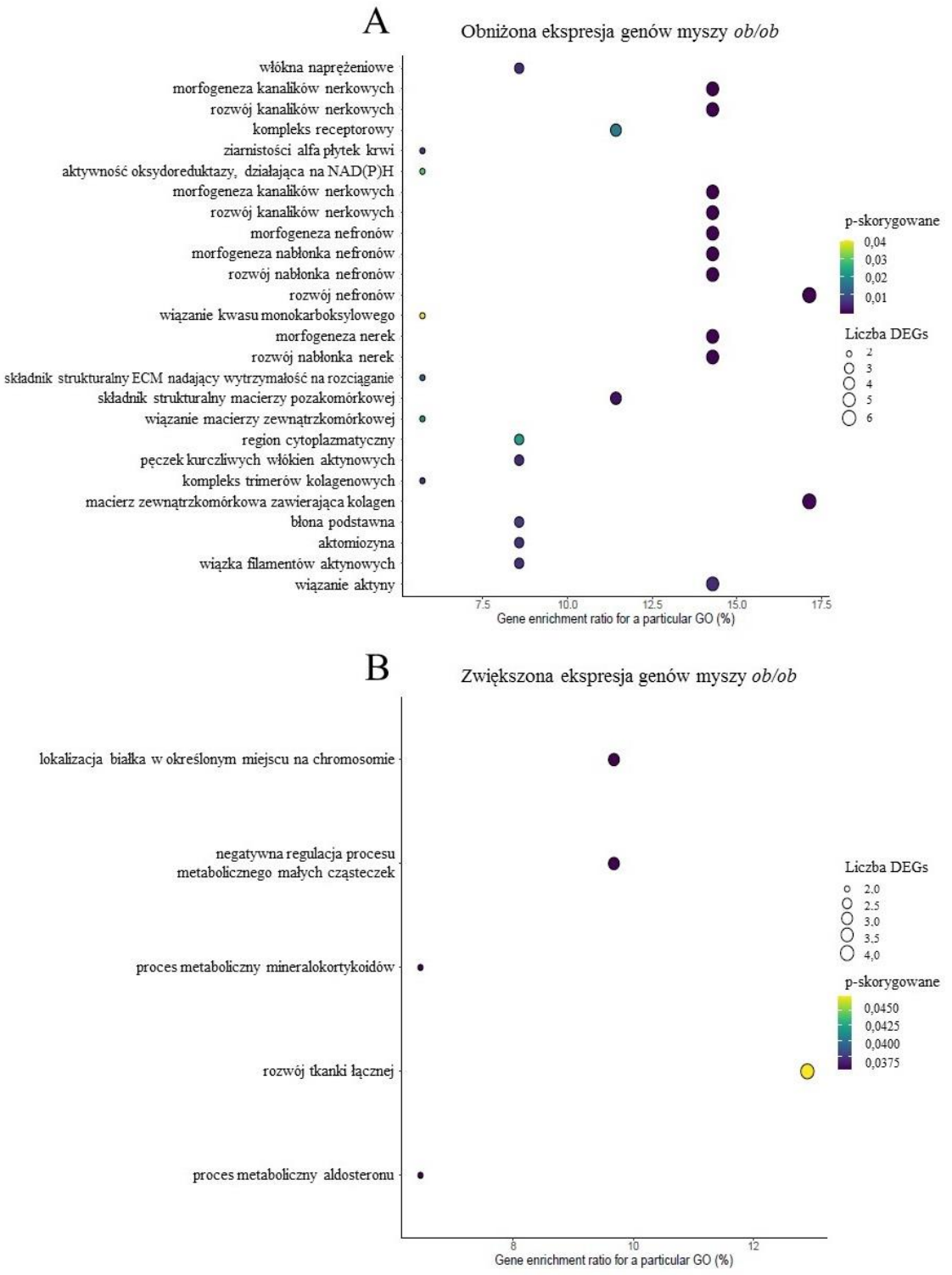
W GCs myszy *db/db* obniżona ekspresja genów aldo-keto reduktazy 1C13 (ang. aldo-keto reductase family 1, member C13 - *Akr1c13*) i aldo-keto reduktazy 1C18 (*Akr1c18*) związana była m.in. z: „procesem metabolicznym steroidów", „procesem metabolicznym progesteronu" (Rys. 21A; Suplementy: Tabela S5). W GCs myszy *db/db* zwiększona ekspresja genów receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu beta (ang. platelet derived growth factor receptor beta - *Pdgfrb*), kolagenu typu 11 alfa 1 (ang. collagen, type XI, alpha 1 - *Col11a1*), agrekanu 9 (ang. A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9 - *Adamts9*) związana była m. in. z: „rozwojem tkanki mięśnia sercowego" (Rys. 21B; Suplementy: Tabela S6).



Rys. 21. Analiza funkcjonalna genów ulegających różnicowej ekspresji zidentyfikowanych w komórkach ziarnistych myszy *db/db*. A) Geny wykazujące obniżoną ekspresję w komórkach ziarnistych myszy *db/db*. B) Geny wykazujące zwiększoną ekspresję w komórkach ziarnistych myszy *db/db*. Na rysunkach przedstawiono tylko podkategorie z najniższą wartością p. Oś x przedstawia ilość genów o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji zaklasyfikowanych do poszczególnej podkategorii względem wszystkich genów należącej do danej kategorii. Oś y przedstawia nazwę procesu. Wielkość kółka określa liczbę wzbogaconych genów ulegających różnicowej ekspresji dla poszczególnego procesu, a kolor przedstawia wartości log10 (p-skorygowane).

Rysunek 22 przedstawia analizę funkcjonalną DEGs w GCs myszy *ob/ob*.

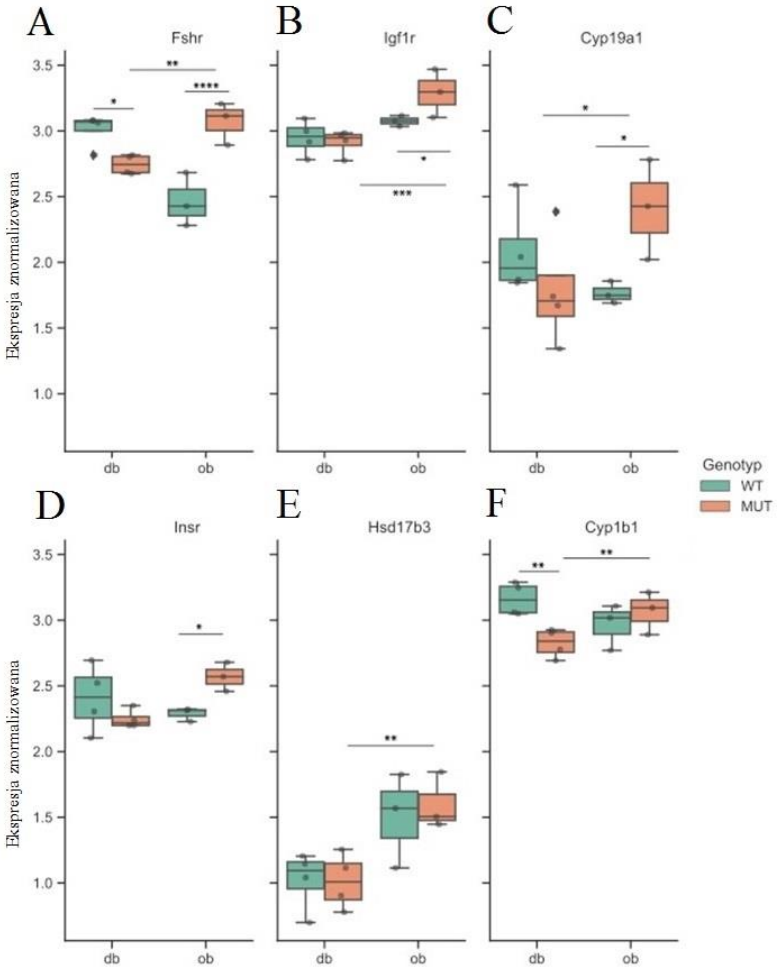
W GCs myszy *ob/ob* obniżona ekspresja genów *Col4a2* i *Col16a1* związana była m.in. z: „macierzą pozakomórkową zawierającą kolagen" (Rys. 22A; Suplementy: Tabela S7). W GCs myszy *ob/ob* zwiększona ekspresja genów acylotransferazy diacyloglicerolu 2 (ang. diacylglycerol O-acyltransferase 2 - *Dgat2*) i fruktozo-1,6-bisfosfatazy (ang. fructose bisphosphatase 1 - *Fbp1*) związana była m. in. z: „negatywną regulacją procesu metabolicznego małych cząsteczek" (Rys. 22B; Suplementy: Tabela S8).



Rys. 22. Analiza funkcjonalna genów ulegających różnicowej ekspresji zidentyfikowanych w komórkach ziarnistych myszy *ob/ob*. A) Geny wykazujące obniżoną ekspresję w komórkach ziarnistych myszy *ob/ob*. B) Geny wykazujące zwiększoną ekspresję w komórkach ziarnistych myszy *ob/ob*. Na rysunkach przedstawiono tylko podkategorie z najniższą wartością p. Oś x przedstawia ilość genów o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji zaklasyfikowanych do poszczególnej podkategorii względem wszystkich genów należącej do danej kategorii. Oś y przedstawia nazwę procesu. Wielkość kółka określa liczbę wzbogaconych genów ulegających różnicowej ekspresji dla poszczególnego procesu, a kolor przedstawia wartości log10 (p-skorygowane).

Rysunek 23 przedstawia ekspresję genów zaangażowanych w regulację procesu steroidogenezy w GCs modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*).

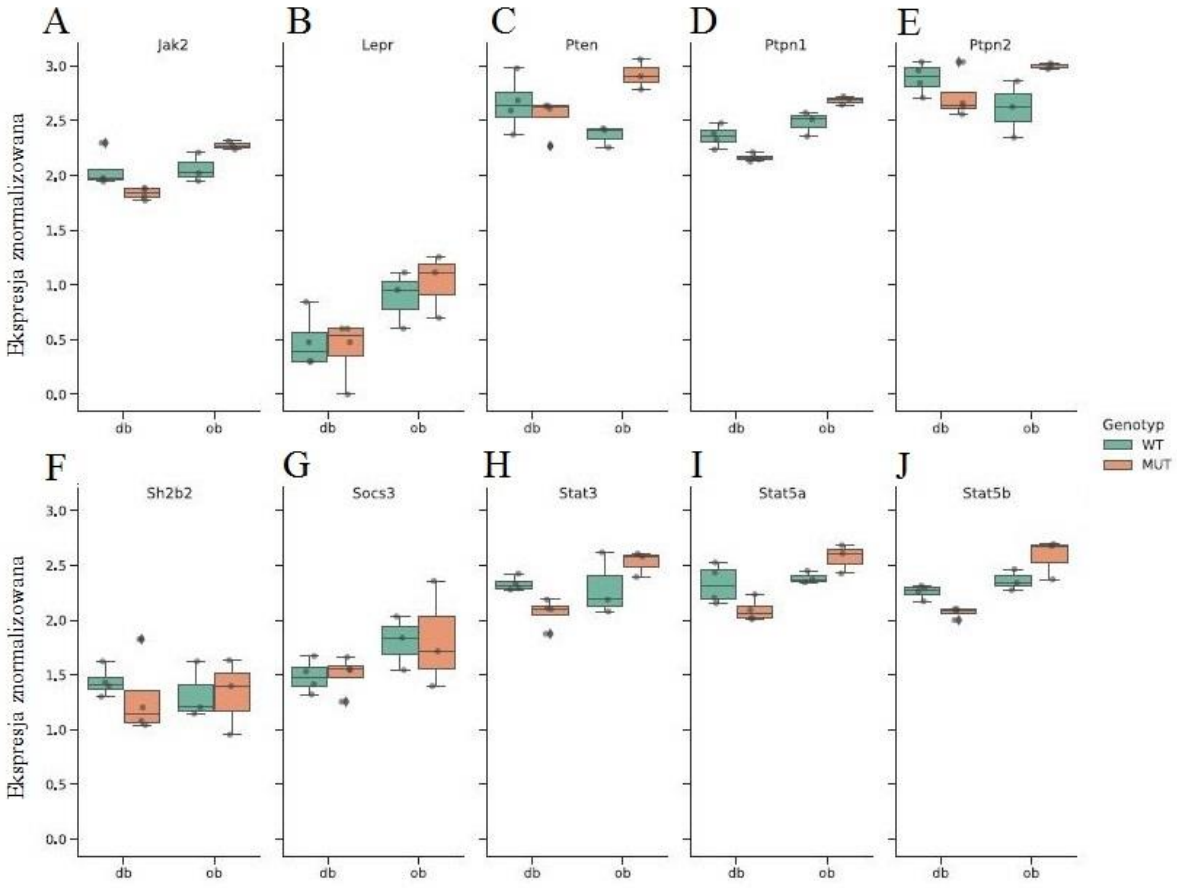
W GCs myszy *db/db* wykazano obniżoną ekspresję *Fshr* (Rys. 23A; p<0,05) oraz *Cyp1b1* (Rys. 23F, p<0,01) na poziomie mRNA. Natomiast w GCs myszy *ob/ob* wykazano wzrost ekspresji *Fshr* (Rys. 23A; p<0,001), *Igf1r* (Rys. 23B; p<0,05), *Cyp19a1* (Rys. 23C; p<0,05), *Insr* (Rys. 23D; p<0,05) na poziomie mRNA. Ponadto wykazano, że ekspresja genów *Fshr* (Rys. 23A; p<0,01), *Igf1r* (Rys. 23B; p<0,001), *Cyp19a1* (Rys. 23C; p<0,05), *Hsd17b3* (Rys. 23E; p<0,01), *Cyp1b1* (Rys. 23F; p<0,01) na poziomie mRNA jest wyższa w GCs myszy *ob/ob* w porównaniu do myszy *db/db*.



Rys. 23. Ekspresja A) receptora hormonu folikulotropowego (*Fshr*), B) receptora insulino-podobnego czynnika wzrostu typu 1 (*Igf1r*), C) cytochromu P450 izoformy 19a1 - cytochrom $P450_{arom}$ (*Cyp19a1*), D) receptora insuliny (*Insr*), E) dehydrogenazy 17-beta-hydroksysteroidowej typu 3 (*Hsd17b3*), F) cytochromu P450 izoformy 1b1 (*Cyp1b1*) na poziomie mRNA w komórkach ziarnistych modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) na podstawie analizy RNA-seq. Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Liczba wykorzystanych prób do analizy: myszy *db/db* n=8; myszy *ob/ob* n=6. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (* p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001; p<0,0001). MUT – myszy homozygotyczne, WT – myszy heterozygotyczne.

Rysunek 24 przedstawia ekspresję genów szlaku sygnałowego leptyny w GCs modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*).

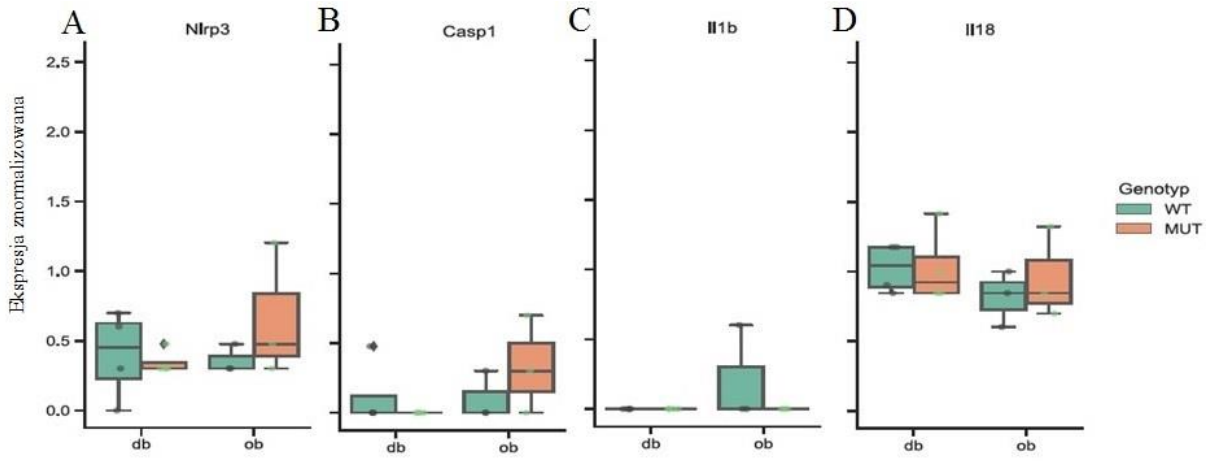
W GCs myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob* nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji genów szlaku sygnałowego leptyny pomiędzy grupą badaną a kontrolną (Rys. 24). Ponadto nie wykazano istotnie statystycznie różnic w ekspresji genów szlaku sygnałowego leptyny w GCs myszy *db/db* w porównaniu do myszy *ob/ob*.



Rys. 24. Ekspresja A) kinazy tyrozynowej Janus-2 (*Jak2*), B) receptora leptyny (*Lepr*), C) Pten (ang. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten - Pten), D) fosfatazy tyrozynowej N1 (ang. protein tyrosine phosphatase N1 – *Ptpn1*), E) fosfatazy tyrozynowej PTPN2 (*Ptpn2*), F) SH2B 2 (ang. SH2B adaptor protein 2 - *Sh2b2*), G) supresor cytokiny sygnałowej 3(*Socs3*), H) gen kodujący białka przenoszące sygnał i aktywujące transkrypcję 3 (*Stat3*), I) gen kodujący białka przenoszące sygnał i aktywujące transkrypcję 5 podjednostka a (*Stat5a*), J) gen kodujący białka przenoszące sygnał i aktywujące transkrypcję 5 podjednostka b (*Stat5b*) na poziomie mRNA w komórkach ziarnistych modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) na podstawie analizy RNA-seq. Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Liczba wykorzystanych prób do analizy: myszy *db/db* n=8; myszy *ob/ob* n=6. Oś X wskazuje badaną grupę myszy. Oś Y wskazuje normalną ekspresję genu. MUT – myszy homozygotyczne, WT – myszy heterozygotyczne.

Rysunek 25 przedstawia ekspresję genów inflamasomu NLRP3 w GCs modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*).

W GCs myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob* nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji genów inflamasomu NLRP3 w GCs myszy *db/db* oraz *ob/ob* (Rys. 25).

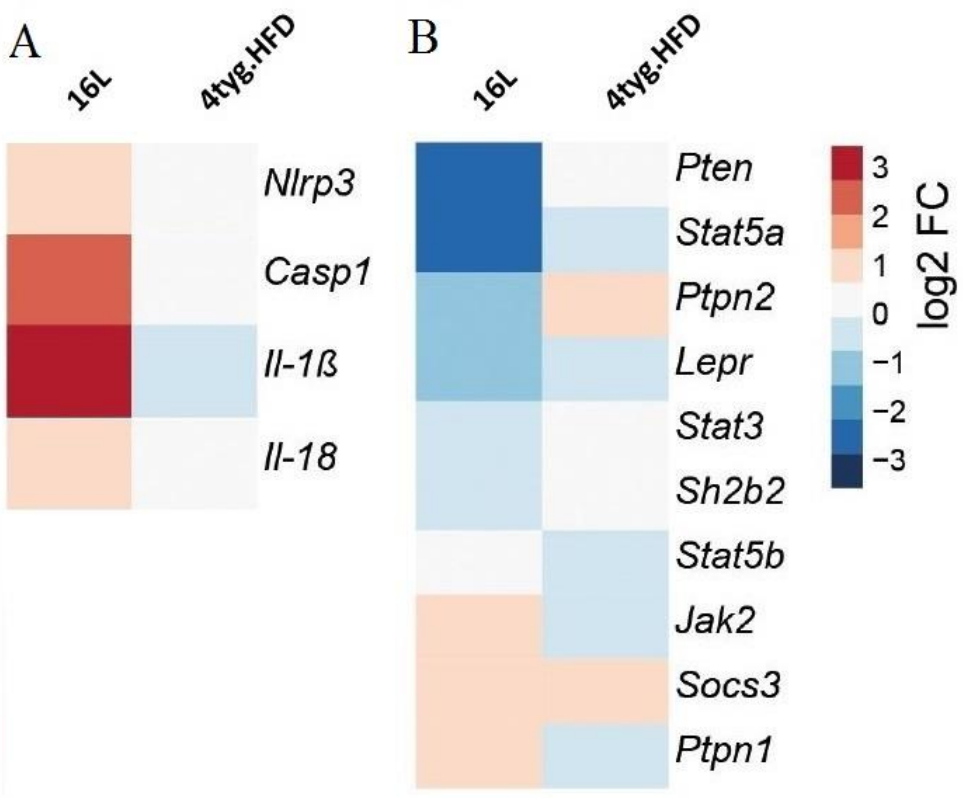


Rys. 25. Ekspresja A) NOD-like receptor protein 3 (*Nlrp3*), B) kaspazy 1 (*Casp1*), C) interleukiny 1β (*Il-1β*), D) interleukiny 18 (*Il-18*) na poziomie mRNA w komórkach ziarnistych modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) na podstawie analizy RNA-seq. Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Liczba wykorzystanych prób do analizy: myszy *db/db* n=8; myszy *ob/ob* n=6. Oś X wskazuje badaną grupę myszy. Oś Y wskazuje normalną ekspresję genu. MUT – myszy homozygotyczne, WT – myszy heterozygotyczne.

4.4. Zadanie badawcze 4. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w komórkach wzgórka jajonośnego we wczesnej fazie otyłości

Rysunek 26 przedstawia ekspresję genów inflamasomu NLRP3 oraz szlaku sygnałowego leptyny w CCs w grupie myszy 4 tyg. HFD (wczesna otyłość) oraz modelu farmakologicznej hiperleptynemii.

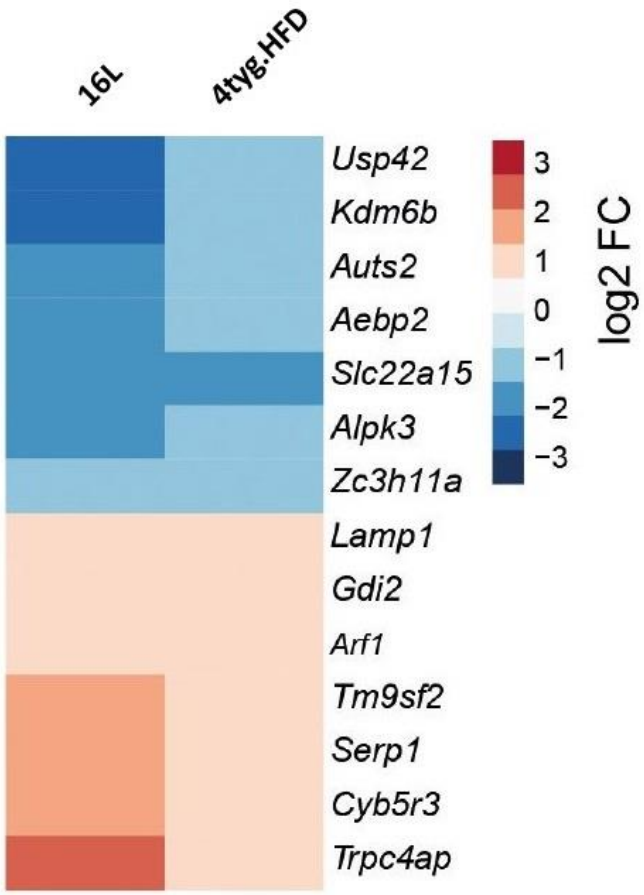
W CCs myszy 16L wykazano wzrost ekspresji *Nlrp3, Casp1, Il-1β* i *Il-18* na poziomie mRNA (Rys. 26A). Ponadto w CCs myszy 16L wykazano obniżenie ekspresji *Pten, Stat5a* (Rys. 26B) oraz podwyższoną ekspresję *Jak2, Socs3, Ptpn1* na poziomie mRNA (Rys. 26B).



Rys. 26. Mapy cieplne przedstawiające geny o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji zidentyfikowanych w komórkach wzgórka jajonośnego myszy wczesnej otyłości modelu otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Model DIO: myszy szczepu B6 karmione przez okres 4 tygodni dietą standardową (ang. chow diet, CD, 4 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD, 4 tyg. HFD). Model farmakologicznej hiperleptynemii: myszy szczepu B6, którym podawano dootrzewnowo 100 µg leptyny przez 16 dni (16L) lub sól fizjologiczną (16K). Mapa cieplna przestawiająca profil ekspresji genów A) inflamasomu NLRP3 oraz B) szlaku sygnałowego leptyny w komórkach wzgórka jajonośnego myszy 4 tyg. HFD oraz myszy 16L. Wysoką wartość ekspresji genu oznaczono kolorem czerwonym (+3), a niską wartość ekspresji genu oznaczono kolorem niebieskim (-3). FC – (ang. fold change) wartość wskazująca wielokrotność różnicy (log2) pomiędzy transkryptomami grupy badanej a grupy kontrolnej.

Rysunek 27 przedstawia ekspresję genów wykazujących podobny poziom ekspresji w CCs we wczesnej fazie otyłości z wykorzystaniem myszy karmionych 4 tyg. HFD oraz modelu farmakologicznej hiperleptynemii.

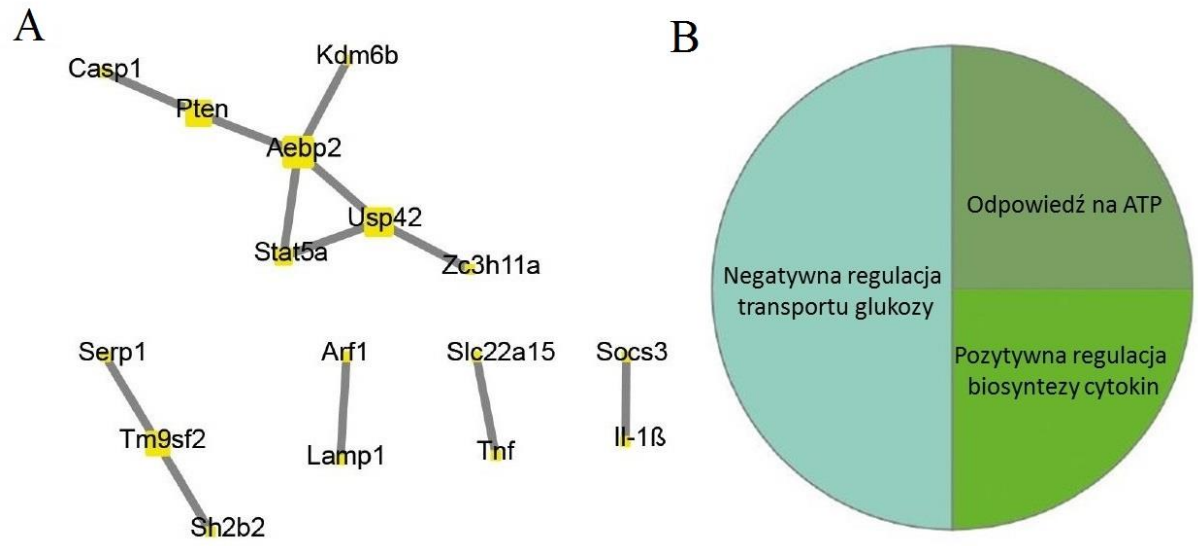
W CCs myszy 4 tyg. HFD oraz 16L zidentyfikowano następujące geny, których ekspresja na poziomie mRNA była podwyższona: gen kodujący białko błonowe typu I związane z lizosomami (ang. lysosomal-associated membrane protein 1 – *Lamp1*), gen kodujący białko GDI1 (ang. GDP Dissociation Inhibitor 1 – *Gdi1*), gen kodujący białko ARF1 (ang. ADP Ribosylation Factor 1 – *Arf1*), gen kodujący białko TM9SF2 (ang. Transmembrane 9 superfamily member 2 - *Tm9sf2*), Serpina 1 (ang. serpin family A member 1 – *Serp1*), reduktaza cytochromu b5 3 (ang. cytochrome b5 reductase 3 - *Cyb5r3*), gen kodujący białko TRPC4AP (ang. Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 4 Associated Protein - *Trpc4ap*) (Rys. 27). Ponadto w CCs myszy 4 tyg. HFD oraz 16L zidentyfikowano następujące geny, których ekspresja na poziomie mRNA była obniżona: gen kodujący białko USP42 (ang. Ubiquitin specific peptidase 42 - *Usp42*), demetylaza lizynowa 6b (ang. Lysine demethylase 6B - *Kdm6b*), gen kodujący Activator Of Transcription And Developmental Regulator AUTS2 (ang. autism susceptibility candidate 2 - *Auts2*), gen kodujący białko AEBP2 (ang. Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2 - *Aebp2*), gen kodujący białko SLC22A15 (ang. solute carrier family 22, member 15 - *Slc22a15*), gen kodujący białko ALPK3 (ang. Alpha-protein kinase 3 - *Alpk3*), gen kodujący białko ZC3H11A (ang. Zinc Finger CCCH-Type Containing 11A - *Zc3h11a*) (Rys. 27).



Rys. 27. Mapa cieplna przedstawiająca geny o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji zidentyfikowanych w komórkach wzgórka jajonośnego myszy modelu otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Model DIO: myszy szczepu B6 karmione przez okres 4 tygodni dietą standardową (ang. chow diet, CD, 4 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD, 4 tyg. HFD). Model farmakologicznej hiperleptynemii: myszy szczepu B6, którym podawano dootrzewnowo 100 µg leptyny przez 16 dni (16L) lub sól fizjologiczną (16K). Mapa cieplna przedstawiająca profil ekspresji genów w grupie myszy 4 tyg. HFD i 16L, wykazujących podobny poziom ekspresji. Wysoką wartość ekspresji genu oznaczono kolorem czerwonym (+3), a niską wartość ekspresji genu oznaczono kolorem niebieskim (-3). FC – (ang. fold change) wartość wskazująca wielokrotność różnicy (log2) pomiędzy transkryptomami grupy badanej a grupy kontrolnej.

Rysunek 28 przedstawia sieć wzajemnych oddziaływań oraz analizę funkcjonalną genów przedstawionych na Rys. 26 i Rys. 27.

Przy użyciu programu Cytoscape przeprowadzono analizę, za pomocą której wyróżniono 5 głównych kategorii (klastrów) wykazujących silną interakcję pomiędzy genami inflamasomu NLRP3, szlaku sygnałowego leptyny oraz genów wykazujących podobny profil ekspresji w CCs myszy 4 tyg. HFD i 16L (Rys. 28A). Na podstawie analizy funkcjonalnej wyszczególniono 3 kategorie GO, które obejmowały: „negatywną regulację transportu glukozy", „odpowiedź na ATP" oraz „pozytywną regulację biosyntezy cytokin" (Rys. 28B).

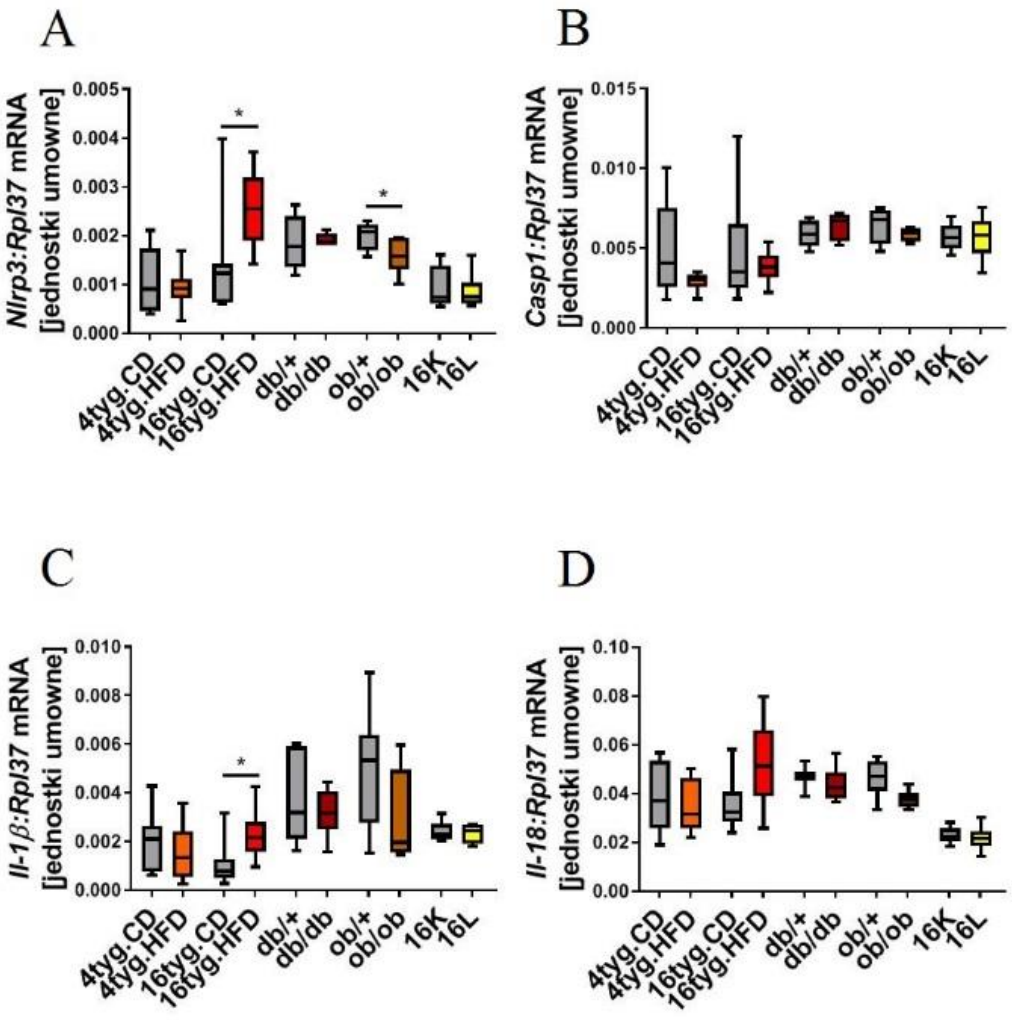


Rys. 28. A) Wizualizacja sieci interakcji pomiędzy genami inflamasomu NLRP3, szlaku sygnałowego leptyny oraz genów wykazujących podobny profil ekspresji w komórkach wzgórka jajonośnego myszy karmionych 4 tygodnie HFD i modelu hiperleptynemii. B) Diagram kołowy przedstawiający 3 główne kategorie GO (ang. Gene Ontology), które zostały zidentyfikowane w obydwu badanych modelach. Wizualizację sieci dokonano przy użyciu oprogramowania Cytoscape.

4.5. Zadanie badawcze 5. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy

Rysunek 29 przedstawia ekspresję *Nlpr3, Casp1, Il-1β* i *Il-18* na poziomie mRNA w wątrobie myszy modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

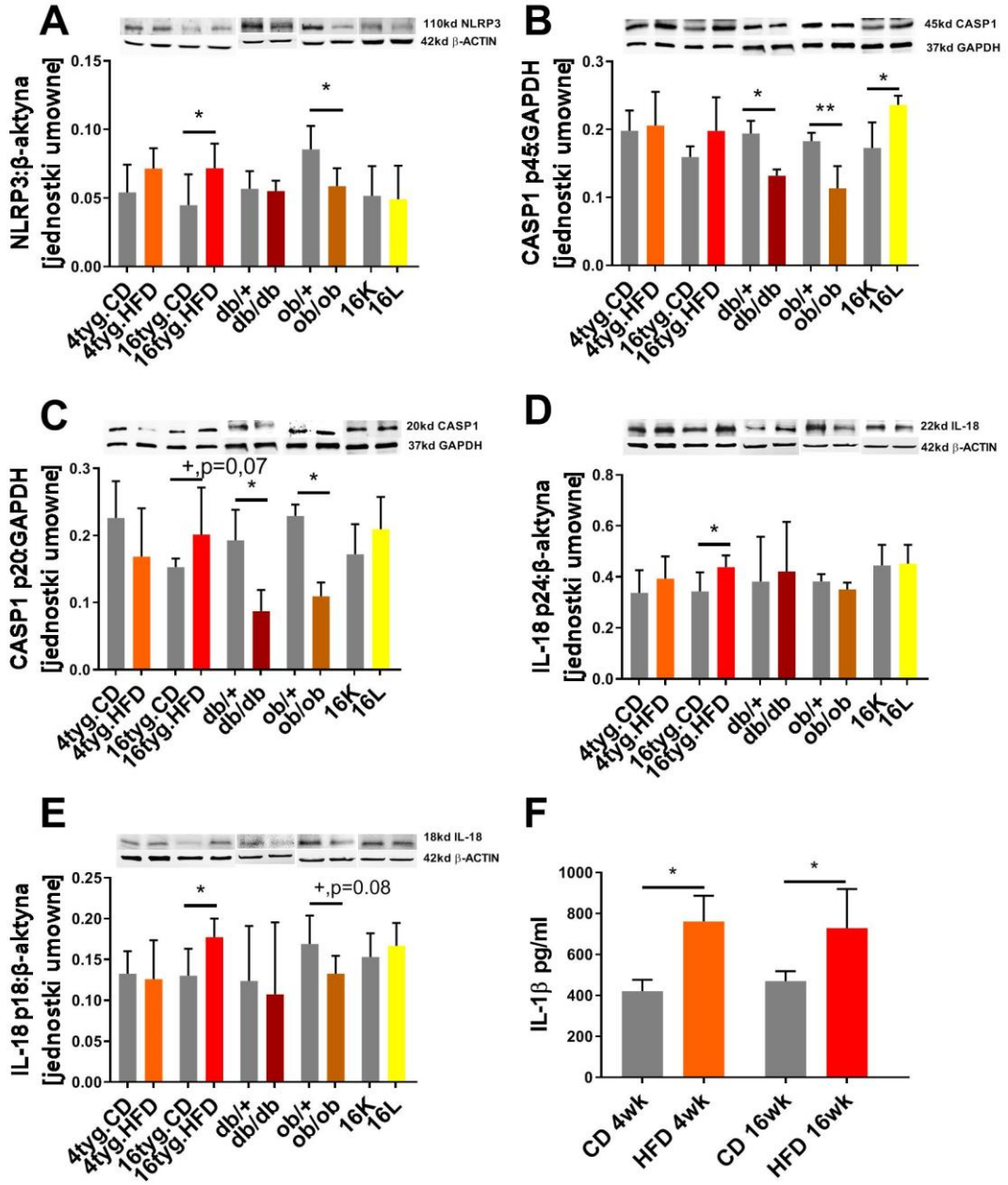
W wątrobie myszy 16 tyg. HFD wykazano wzrost ekspresji *Nlrp3* (Rys. 29A; $p<0,05$) oraz *Il-1β* (Rys. 29B; $p<0,05$). W wątrobie myszy *ob/ob* wykazano obniżenie ekspresji *Nlpr3* (Rys. 29A; $p<0,05$). Ponadto nie wykazano zmian ekspresji w wątrobie myszy 4 tyg. HFD, *db/db* oraz 15L.



Rys. 29. Ekspresja A) NOD-like receptor protein 3 (*Nlrp3*), B) kaspazy 1 (*Casp1*), C) interleukiny 1β (*Il-1β*), D) interleukiny 18 (*Il-18*) na poziomie mRNA w wątrobie myszy modelu otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Model DIO: myszy szczepu B6 karmione przez okres 4 tygodni dietą standardową (ang. chow diet, CD, 4 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD, 4 tyg. HFD) oraz 16 tygodni dietą standardową (16 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (16 tyg. HFD). Otyłość uwarunkowana 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). Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Liczba wykorzystanych prób do analizy Real-time PCR: n=6-9. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (*p<0,05).

Rysunek 30 przedstawia ekspresję NLRP3, CASP1 p45, CASP1 p20, IL-18 p24, IL-18 p18 na poziomie białka w wątrobie myszy modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii, a także stężenie IL-1β w wątrobie myszy modelu DIO.

W wątrobie myszy 4 tyg. HFD wykazano wzrost stężenia IL-1β (Rys. 30F; $p<0,05$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto wykazano wzrost ekspresji NLRP3 (Rys. 30A; $p<0,05$), CASP1 p20 (Rys. 30C; $p=0,07$), IL-18 p24 (Rys. 30D; $p<0,05$) IL-18 p18 (Rys. 30E; $p<0,05$) i stężenia IL-1β (Rys. 30F; $p<0,05$) w wątrobie myszy 16 tyg. HFD. W wątrobie myszy *db/db* wykazano obniżenie ekspresji CASP1 p45 (Rys. 30B; $p<0,05$) oraz CASP1 p20 (Rys. 30C; $p<0,05$). Natomiast u myszy *ob/ob* wykazano obniżenie ekspresji NLRP3 (Rys. 30A; $p<0,05$), CASP1 p45 (Rys. 30B; $p<0,01$), CASP1 p20 (Rys. 30C; $p<0,05$) oraz IL-18 p18 (Rys. 30E; $p=0,08$). Dodatkowo w wątrobie myszy 16L wykazano wzrost ekspresji CASP1 p45 (Rys. 30B; $p<0,05$).



Rys. 30. Ekspresja A) NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), B) pro-kaspazy 1 (CASP1 p45), C) kaspazy 1 podjednostki p20 (CASP1 p20), D) interleukiny-18 podjednostki p24 (IL-18 p24), E) interleukiny 18 podjednostki p18 (IL-18 p18) na poziomie białka w wątrobie myszy modelu otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Stężenie F) interleukiny 1β (IL-1β) w wątrobie myszy modelu DIO. Model DIO: myszy szczepu B6 karmione przez okres 4 tygodni dietą standardową (ang. chow diet, CD, 4 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD, 4 tyg. HFD) oraz 16 tygodni dietą standardową (16 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (16 tyg. HFD). Otyłość uwarunkowana 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). Wartości przedstawiono jako średnie ±SEM. Różnice statystyczne pomiędzy grupami określono na podstawie testu t-studenta i nieparametrycznego testu Wilcoxona dla analizy Western blotting oraz nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya dla metody immunoenzymatycznej. Liczba wykorzystanych prób do analizy Western blotting: n=4-8, metody immunoenzymatycznej: n=4. Gwiazdki wskazują różnice istotne statystycznie (*p<0,05; **p<0,01; +p=0,07; p=0,06; p=0,05).

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Otyłość prowadzi do wystąpienia stanu zapalnego jajników, czego efektem może być brak owulacji, obniżenie jakości oocytów, nieprawidłowy rozwój zarodka, czy też wyższe ryzyko śmierci płodu. Dlatego lepsze poznanie patogenezy powstania procesu zapalnego w jajniku przyczyni się do zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw niewydolności jajników i niepłodności w trakcie rozwoju otyłości. Rozrost białej tkanki tłuszczowej podczas rozwoju otyłości skutkuje zwiększeniem produkcji leptyny, która w jajniku wpływa na takie procesy jak steroidogeneza, folikulogeneza czy też funkcjonowanie CL. Jednym z czynników, który bierze udział w aktywacji cytokin prozapalnych takich jak IL-1β i IL-18 jest inflamasom NLRP3, którego rola w jajniku jest słabo poznana. W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono kompleksowe podejście prowadzące do wyjaśnienia wpływu szlaku sygnałowego leptyny na zmiany ekspresji genów i białek inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy z wykorzystaniem różnych modeli badawczych.

5.1. Określenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy

Jednym z celów niniejszej rozprawy było określenie ekspresji inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka podczas fazy *estrus* i *diestrus* w jajniku myszy. Badania wykazały zwiększoną aktywność inflamasomu NLRP3 w fazie *diestrus*, poprzez zwiększenie ekspresji NLRP3 oraz IL-18 na poziome białka. Przeprowadzone badania potwierdziły immunolokalizację NLRP3 w GCs, TCs i oocytach zarówno metodą IHC jak i IF. Wyniki dotyczące immunolokalizacji NLRP3 są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Zhang i in. 2019, którzy po raz pierwszy wykazali ekspresję NLRP3 na poziomie białka w GCs, TCs i oocytach (Zhang i in. 2019). Powyższe wyniki mogą sugerować udział inflamasomu NLRP3 w procesach zapalnych podczas owulacji u myszy (Zhang i in. 2019). Co więcej, wyniki badań Navarro-Pando i in. 2021 potwierdziły udział inflamasomu NLRP3 jako czynnika istotnego w procesie starzenia się jajników oraz płodności (Navarro-Pando i in. 2021). Inne badania sugerują kluczową rolę inflamasomu NLRP3 w patofizjologii PCOS (Guo i in. 2020; Rostamtabar i in. 2020; Wang i in. 2017). Zatem inflamasom NLRP3 może przyczyniać się do regulacji procesów fizjologicznych w jajniku w trakcie cyklu płciowego.

5.2. Określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że w trakcie rozwoju otyłości w jajniku profil ekspresji inflamasomu NLRP3 zmienia się. Po szybkim wzroście ekspresji inflamasomu NLRP3 we wczesnej fazie otyłości (4 tyg. HFD), dochodzi do obniżenia ekspresji NLRP3, CASP1 oraz IL-18 w późnej fazie otyłości (16 tyg. HFD). Co więcej, wykorzystując model farmakologicznej hiperleptynemii oraz model otyłości uwarunkowanej genetycznie, wykazano funkcjonalne połączenie pomiędzy szlakiem sygnałowym leptyny a aktywacją inflamasomu NLRP3 w jajnikach myszy.

Inflamasom NLRP3 jest kluczowym czynnikiem wrodzonej odporności, często związanym z chorobami u ludzi (He i in. 2016a). Uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki dowodzące aktywacji inflamasomu NLRP3 w jajniku we wczesnej fazie otyłości (4 tyg. HFD), są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi na akumulację czynników prozapalnych w jajniku myszy po krótkotrwałym stosowaniu HFD (6 tyg. HFD) (Shen i in. 2021). Zwiększona ekspresja IL-18 na poziome białka u myszy 4 tyg. HFD wspomaga powstanie odpowiedzi zapalnej w jajniku myszy modelu DIO. Niemniej jednak regulacja stanu zapalnego jajników w późnej fazie otyłości (16 tyg. HFD) wydaje się być niezależna od aktywacji inflamasomu NLRP3, ponieważ ekspresja aktywnych form CASP1 i IL-18 na poziomie białka była znacznie obniżona. Należy podkreślić, że podwyższony poziom IL-1β w jajnikach myszy 16 tyg. HFD potwierdziły występowanie stanu zapalnego w jajnikach. Badania przeprowadzone przez Nteeba i in. 2013 wykazały zwiększoną ekspresję cytokin prozapalnych takich jak *Il-1β*, *Il-6* czy *Tnf-α* na poziomie mRNA w jajniku myszy 24 tyg. HFD (Nteeba i in. 2013). Dlatego uzyskane wyniki sugerują istnienie alternatywnych szlaków do inflamasomu NLRP3, pośredniczących w zwiększaniu ekspresji IL-1β w jajnikach myszy 16 tyg. HFD (Donado i in. 2020; Jain i in. 2020; Pyrillou i in. 2020; Schmidt & Lenz 2012; Zhu & Kanneganti 2017).

Wyniki uzyskane w modelu DIO wskazały na istotne oddziaływanie pomiędzy szlakiem sygnałowym leptyny a aktywacją inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy. Wiele czynników przyczynia się do aktywacji inflamasomu NLRP3 podczas otyłości,

do których można zaliczyć metabolity komórkowe, węglowodany czy lipidy (Wani i in. 2021). Co więcej leptyna należąca do cytokin prozapalnych (Iikuni i in. 2008; La Cava 2017), zwiększa aktywację inflamasomu NLRP3 *in vitro* (Fu i in. 2017). Celem zweryfikowania hipotezy czy obniżenie ekspresji inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy 16 tyg. HFD jest związane z lokalnym ustanowieniem leptynooporności (Wołodko i in. 2020), zbadano aktywność inflamasomu NLRP3 w jajnikach myszy modelu otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i myszy *ob/ob*) oraz modelu farmakologicznej otyłości. Myszy *ob/ob* wykazują całkowity brak produkcji leptyny (Wauman i in. 2017), podczas gdy myszy *db/db* wykazują ogólnoustrojową hiperleptynemię w połączeniu z niedoborem LepRb (Suriano i in. 2021), co umożliwiając domniemane działanie szlaku sygnałowego leptyny za pośrednictwem innych niż LepRb receptorów (szlak niekanoniczny) (Li i in. 2013). Co ważne, zastosowanie takich modeli może pomóc w wyjaśnieniu, w jaki sposób różnice w dysfunkcji szlaku sygnałowego leptyny w jajnikach otyłych matek wpływa na folikulogenezę i jakość oocytów (Sharma & Galvão 2022; Wołodko i in. 2020). Model farmakologicznej hiperleptynemii, charakteryzuje się zwiększonym poziomem leptyny w osoczu oraz aktywności szlaku sygnałowego leptyny w jajnikach myszy, pomimo braku otyłości (Wołodko i in. 2020). U myszy *db/db* nie zaobserwowano różnic w ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka, z wyjątkiem obniżonej ekspresji *Il-1β* na poziomie mRNA. Natomiast w jajnikach myszy 16L zaobserwowano zwiększoną ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 oraz stężenie IL-1β. Co więcej u myszy *ob/ob* ekspresja NLRP3 na poziomie białka oraz stężenie IL-1β były znacząco obniżone. Wyniki badań przeprowadzonych przez Yang i in. 2021, wykazały obniżoną ekspresję NLRP3 w makrofagach otrzewnowych myszy *ob/ob* stymulowanych LPS i nigerycyną w porównaniu do myszy typu dzikiego (Yang i in. 2021). Powyższe podkreśla dominującą rolę leptyny w regulacji aktywności inflamasomu NLRP3. We wczesnej fazie otyłości (4 tyg. HFD), leptyna aktywnie przenosi sygnał w jajniku za pośrednictwem LepRb (Wołodko i in. 2020), przyczyniając się do zwiększonej ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3. Niemniej jednak, w późnej fazie otyłości (16 tyg. HFD) i po ustanowieniu leptynooporności w jajniku (Wołodko i in. 2020), ekspresja elementów szlaku inflamasomu NLRP3 obniża się. Niepowodzenie aktywacji inflamasomu NLRP3 w późniejszej fazie otyłości może być powodowane leptynoopornością w jajniku, co jest związane z zaburzeniem szlaku sygnałowego zależnego od LepRb (szlak kanoniczny) i niezależnego od LepRb (szlak niekanoniczny). Niezmieniony poziom ekspresji NLRP3

na poziomie białka w jajniku myszy *db/db* może sugerować, że leptyna reguluje aktywność inflamasomu NLRP3 przez receptory inne niż LepRb (szlak niekanoniczny). W rezultacie zakłócenia szlaku sygnałowego leptyny w jajniku myszy modelu DIO mogą obejmować nie tylko LepRb (szlak kanoniczny), ale także inne receptory pośredniczące w transdukcji sygnału (szlak niekanoniczny). Zatem kanoniczny i niekanoniczny szlak sygnałowy leptyny kontroluje aktywność inflamasomu NLRP3 w trakcie rozwoju otyłości w jajnikach myszy.

5.3. Analiza transkryptomiczna komórek ziarnistych myszy *db/db* oraz myszy *ob/ob*

W niniejszej pracy doktorskiej potwierdzono, że pomimo podobieństwa morfologicznego istnieją głębokie różnice w transkrypcji genów homozygotycznych myszy *db/db* i *ob/ob*. Analizę trankryptomu GCs pobranych z pęcherzyków antralnych myszy *db/db* i *ob/ob*, przeprowadzono w celu dokładnego określenia skutków działania szlaku sygnałowego leptyny za pośrednictwem LepRb (szlak kanoniczny) oraz bez udziału tego receptora (szlak niekanoniczny) na funkcjonowanie GCs podczas otyłości. W obydwu modelach tylko *Akr1c18* i *Hs3st3b1* wykazały obniżoną ekspresję na poziomie mRNA. Niepłodność obydwu modeli może wynikać m. in. z obniżonej ekspresji *Akr1c18*, który bierze udział w metabolizmie hormonów steroidowych (Veliça i in. 2009). Co więcej *Hs3st3b1* bierze udział w procesach metabolicznych węglowodanów i białek (Zhang i in. 2015). Dodatkowo obniżona ekspresja *Akr1c18* i *Akr1c13* na poziomie mRNA u myszy *db/db* może mieć wpływ na metabolizm P_4 w pęcherzykach jajnikowych (Luo i in. 2021; Miyado i in. 2015). Ponadto obniżenie ekspresji *Pdgfr* na poziomie mRNA u myszy *db/db* zaburza rozwój pęcherzyków jajnikowych, ponieważ jak wiadomo PG ściśle kontrolują końcowy etap rozwoju pęcherzyków (Cai i in. 2007) oraz owulację (Niringiyumukiza i in. 2018). Co ważne wykazano zwiększoną ekspresję *Pdgfrb*, który pośredniczy w działaniu PDGF-BB, specyficznego ligandu odpowiedzialnego za kontrolę rozwoju pęcherzyków, angiogenezę oraz przepuszczalność naczyń (Battegay i in. 1994; Pinkas i in. 2008; Sleer & Taylor 2007). U myszy *db/db* obniżona ekspresja genów związana z metabolizmem steroidów i działaniem PG, wskazuje na wyraźne rozregulowanie kontroli wzrostu pęcherzyków jajnikowych. Co więcej zwiększona ekspresja *Pdgfrb* na poziomie mRNA w GCs, może wskazywać na odpowiedź kompensacyjną związaną z zaburzeniem procesu rozwoju pęcherzyków jajnikowych. Uwalniany przez oocyt PDGF-BB i receptor znajdujący się na GCs opisywany jest jako główny mechanizm kontrolujący wzrost

pęcherzyków jajnikowych (Pinkas i in. 2008; Sleer & Taylor 2007). Z kolei podwyższona ekspresja *Col11a1* i *Adamts9* na poziomie mRNA u myszy *db/db* wskazuje na ich udział w przebudowie ECM podczas rozwoju pęcherzyka jajnikowego. U myszy *db/db* i *ob/ob* wzrost pęcherzyków wydaje się być zatrzymany na etapie pęcherzyka przedowulacyjnego (Garris 2004). W przypadku myszy *ob/ob* wykazano obniżoną ekspresję *Col4a2* i *Col16a1* na poziomie mRNA, które również biorą udział w przebudowie ECM, niezbędnej podczas rozwoju pęcherzyków i owulacji (Woodruff & Shea 2007). Dodatkowo wykazano obniżoną ekspresję genu z rodziny Hox (*Hoxc10* i *Hoxd11*), znanych z ważnej roli w dojrzewaniu pęcherzyków poprzez regulację funkcji GCs (Du & Taylor 2016). Poza tym zwiększona ekspresja *Dgat2* i *Fbp1* na poziomie mRNA w GCs myszy *ob/ob* może mieć wpływ na metabolizm lipidów (He i in. 2020; Hu i in. 2020; Liu i in. 2017).

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wskazują na rozbieżny profil ekspresji genów regulujących steroidogenezę w GCs myszy *db/db* i myszy *ob/ob*. U myszy *db/db* wykazano obniżoną ekspresję genów, a u myszy *ob/ob* zwiększoną ekspresję tych samych genów w stosunku do myszy *db/db*. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia o hamującej roli leptyny na steroidogenezę (Lin i in. 2009) i potencjalną zdolność do hamowania owulacji (Bilbao i in. 2013), ponieważ myszy *db/db* charakteryzują się hiperleptynemią (Suriano i in. 2021), podczas gdy myszy *ob/ob* nie mają zdolności do jej syntezy (Wauman i in. 2017). Inne badania wykazały zwiększoną aktywność aromatazy (*Cyp17a1*) w TCs myszy *db/db* i *ob/ob*, cecha obserwowana także w modelu DIO (Long i in. 2022). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej sugerują, że rozwój pęcherzyków jajnikowych u obu modeli może być zaburzony z powodu niewydolności metabolicznej myszy *ob/ob* (Garris 2004) oraz braku aktywacji szlaku sygnałowego leptyny, podczas gdy u myszy *db/db* niekanoniczne działanie leptyny prowadzi do zwiększenia ekspresji genów kontrolujących tworzenie naczyń, ale ze znacznymi zmianami w ekspresji genów zaangażowanych w steroidogenezę. Pomimo rozbieżności w ekspresji genów, zmiany u obydwu modeli dotyczyły szlaków kontrolujących wzrost pęcherzyków jajnikowych oraz owulacji.

Co więcej, nie wykazano zmian w ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnałowym leptyny oraz inflamasomem NLRP3 na poziomie mRNA w GCs myszy *db/db* i myszy *ob/ob*. Badania przeprowadzone przez Poulsen i in. 2019 wykazały w ludzkich GCs podczas owulacji udział wielu genów związanych z reakcją zapalną

(Poulsen i in. 2019). Uzyskane wyniki sugerują że brak zmian w ekspresji genów szlaku sygnałowego leptyny oraz inflamasomu NLRP3 w GCs myszy *db/db* i myszy *ob/ob* może skutkować zaburzeniem późnej folikulogenezy i skutecznej owulacji.

5.4. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w komórkach wzgórka jajonośnego we wczesnej fazie otyłości

Komórki wzgórka jajonośnego są wiarygodnym wskaźnikiem środowiska wewnątrzpęcherzykowego (Wołodko i in. 2021), których transkryptom wykorzystywano do przewidywania jakości oocytów i zarodków (Uyar i in. 2013). Zatem ponownie przeanalizowano globalną ekspresję genów w CCs pobranych od superowulowanych myszy modelu DIO i farmakologicznej hiperleptynemii (Wołodko i in. 2020), celem potwierdzenia oddziaływania szlaku sygnałowego leptyny i aktywacji inflamasomu NLRP3. U myszy 16L potwierdzono zwiększenie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w CCs, czego nie zaobserwowano u myszy 4 tyg. HFD. W związku z tym zbadano czy DEGs wykazujące podobny poziom ekspresji w obydwu grupach mogą wchodzić w interakcję z genami inflamasomu NLRP3. Analiza funkcjonalna umożliwiła wyszczególnienie kluczowych kategorii charakterystycznych dla dojrzewania oocytów, takich jak regulacja transportu glukozy, odpowiedź na ATP i regulację biosyntezy cytokin. Wydaje się, że regulacja metaboliczna w pęcherzykach przedowulacyjnych kontroluje główne etapy dojrzewania gamet żeńskich, takich jak wznowienie mejozy, kondensację chromatyny i dojrzewanie cytoplazmy (Wołodko i in. 2021). Wykazano, że metabolizm glukozy, który ma miejsce głównie w CCs (Sanfins i in. 2018) jest kluczowy do nabycia kompetencji rozwojowej przez oocyty (Wilding i in. 2009). Ponadto obniżona zawartość ATP w oocytach jest przyczyną niepowodzenia zapłodnienia, zatrzymania podziału oraz nieprawidłowego rozwoju zarodka (Zhao & Li 2012). Co więcej, badania wskazują na udział inflamasomu NLRP3 w procesie owulacji (Zhang i in. 2019). Biorąc pod uwagę zarówno bezpośrednią jak i pośrednią rolę leptyny w procesie owulacji (Wołodko i in. 2021), zaburzenia szlaku sygnałowego leptyny jak i brak aktywacji inflamasomu NLRP3 w późnej fazie otyłości, mogą odpowiadać za zwiększony odsetek braku owulacji u otyłych matek (Hou i in. 2016; Wu i in. 2010). Brak zmian w ekspresji genów inflamasomu NLRP3 u myszy 4 tyg. HFD można przypisać niskiemu poziomowi pokrycia bibliotek, a także niskiej ekspresji genów na poziomie mRNA. W protokole sekwencjonowania RNA-seq zastosowano zaledwie 50 komórek od każdej z myszy, co ogranicza analizę genów

o niskiej ekspresji. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że istniejące w CCs oddziaływanie między leptyną a inflamasomem NLRP3 może mieć negatywny wpływ na dojrzewanie oocytów, owulację i ostatecznie rozwój zarodka.

5.5. Określenie wpływu leptyny na ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy

Badania wykazały zwiększoną ekspresję NLRP3, CASP1, IL-18 na poziomie białka i stężenie IL-1β w wątrobie myszy 16 tyg. HFD i tym samym opóźnioną aktywację inflamasomu NLRP3 w porównaniu do jajników. Oznacza to, że jajniki są nie tylko organem uwalniającym duże ilości cytokin i czynników zapalnych (Piccinni i in. 2021), ale także bardziej podatnym na szybką odpowiedź prozapalną podczas otyłości. Zmiany w regulacji odpowiedzi zapalnej prawdopodobnie zależą także od ekspozycji organów na czynniki egzogenne. U zdrowych osób wątroba jest nieustannie narażona na działanie czynników pochodzących z diety oraz produktów bakterii komensalnych o wysokim potencjale prozapalnym (Robinson i in. 2016). Zatem komórki układu immunologicznego w wątrobie są poddawane działaniu produktów drobnoustrojów oraz zmiennej aktywności metabolicznej, co skutkuje trwałą i ściśle regulowaną odpowiedzią zapalną (Robinson i in. 2016). Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki są zbliżone z wynikami badań przeprowadzonymi przez Csak i in. 2011, gdzie w wątrobie myszy karmionych HFD przez okres 9 miesięcy wykazano zwiększoną ekspresję CASP1 na poziomie białka i stężenie IL-1β oraz ekspresję wszystkich badanych elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA, czego nie zaobserwowano u myszy 4 tyg. HFD (Csak i in. 2011). Inną ważną obserwacją było obniżenie ekspresji większości badanych elementów szlaku inflamasomu NLRP3 w wątrobie myszy *ob/ob*, czego nie zaobserwowano u myszy *db/db*, co sugeruje że leptyna bezpośrednio moduluje aktywność inflamasomu NLRP3 w wątrobie. Co więcej, badania przeprowadzone na myszach *ob/ob* nie wykazały zmian w ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w wątrobie, również po stymulacji LPS (Csak i in. 2011), co potwierdza istotny udział leptyny w aktywacji inflamasomu NLRP3. Brak istotnych zmian w ekspresji większości genów i białek inflamasomu NLRP3 w wątrobie myszy 16L, wskazuje, że zastosowana dawka leptyny lub okres podawania, nie jest w stanie skutecznie aktywować inflamasomu NLRP3. Uzyskane wyniki potwierdzają zdolność wątroby do regulacji mechanizmów immunologicznych oraz wyjaśniają zwiększoną

wrażliwość jajników na matczyną otyłość, poprzez rozwój wczesnej odpowiedzi zapalnej, co może mieć wpływ na jakość oocytów oraz skuteczność zapłodnienia.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Problem otyłości jest wyzwaniem współczesnego świata. Otyłość przyczynia się do powstania niewydolności jajników, a w konsekwencji niepłodności. Niewydolność jajników charakteryzuje się występowaniem stanu zapalnego, zaburzeniami hormonalnymi, a także lipotoksycznością. Istotnym zagadnieniem jest zbadanie mechanizmów biorących udział w powstawaniu dysfunkcji jajników podczas rozwoju otyłości. W aktywacji cytokin prozapalnych takich jak IL-1β i IL-18 bierze udział inflamasom NLRP3, którego rola w jajniku jest słabo poznana. Obserwowany wzrost produkcji leptyny u otyłych osobników wpływa także na proces steroidogenezy, folikulogenezy i funkcjonowania CL. W niniejszej pracy głównym celem 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 pierwszym etapie przeprowadzonych badań wykazano aktywację inflamasomu NLRP3 w fazie *diestrus* w jajnikach myszy, a także potwierdzono immunolokalizację NLRP3 w GCs, TCs i oocytach. W kolejnym etapie badań wykorzystano różne modele otyłości: model DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. Przeprowadzone badania wykazały oddziaływanie między szlakiem sygnałowym leptyny a aktywacją inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy. We wczesnej fazie otyłości szlak sygnałowy leptyny reguluje aktywność inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy. Natomiast w późnej fazie otyłości, po ustanowieniu leptynooporności u myszy 16 tyg. HFD, zaburzenia kanonicznego i niekanonicznego szlaku sygnałowego leptyny prowadzą do braku aktywacji inflamasomu NLRP3 w jajniku. W kolejnym doświadczeniu nie zaobserwowano wyżej opisanego oddziaływania w GCs myszy *db/db* i myszy *ob/ob*, ze względu na brak zmian w ekspresji genów szlaku sygnałowego leptyny i inflamasomu NLRP3. Niemniej jednak, analiza transkryptomiczna ujawniła zmiany ekspresji genów uczestniczących w steroidogenezie, działaniu PG i uczestniczących w przebudowie ECM, które są kluczowe dla rozwoju pęcherzyków jajnikowych. Wskazuje to na krytyczną rolę szlaku sygnałowego leptyny w regulacji aktywności inflamasomu NLRP3, szczególnie w obrębie TCs i zrębu jajnika otyłych myszy. W dalszym etapie przeprowadzonych badań wykazano, że leptyna zwiększa ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA w CCs myszy 16L. W ostatnim etapie badań wykazano, że aktywacja

inflamasomu NLRP3 podczas wczesnej fazy otyłości w jajniku myszy była sprzeczna z jego aktywacją dopiero podczas późnej fazy otyłości w wątrobie myszy. Uzyskane wyniki sugerują zatem większą wrażliwość jajników na HFD, w szczególności podczas nadwyżki energetycznej podczas matczynej otyłości.

Warto podkreślić, że otrzymane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań stanowią jedno z pierwszych doniesień na temat specyficznego oddziaływania pomiędzy szlakiem sygnałowym leptyny a regulacją aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy, która jest odmienna niż w wątrobie. Uzyskane informacje mogą pomóc w zrozumieniu patofizjologii niewydolności jajników u otyłych matek, dając szansę na opracowanie skutecznej i ukierunkowej terapii, a także monitorowania postępu choroby. Dodatkowo wyniki uzyskane w niniejszej pracy, mogą wskazać nowe kierunki badań i możliwości wykorzystania uzyskanej wiedzy w technikach wspomaganego rozrodu u ludzi i zwierząt.

Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Inflamasom NLRP3 wykazuje zróżnicowaną ekspresję w jajniku myszy w trakcie cyklu płciowego.
2. Szlak sygnałowy leptyny reguluje aktywność inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy we wczesnej fazie otyłości.
3. Leptynooporność w późnej fazie otyłości w jajniku myszy prowadzi do obniżenia aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy.
4. Zaburzenia szlaku sygnałowego leptyny przyczyniają się do zmiany ekspresji genów kluczowych dla rozwoju pęcherzyków w jajniku myszy.
5. Leptyna zwiększa ekspresję genów inflamasomu NLRP3 w komórkach wzgórka jajonośnego myszy 16L.
6. Inflamasom NLRP3 jest wcześniej aktywowany w jajnikach myszy w porównaniu do wątroby podczas rozwoju otyłości.

7. LITERATURA

1. Adam, C.L., Archer, Z.A., Findlay, P.A., Thomas, L., Marie, M., 2002. Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. Neuroendocrinology 75, 250–256. https://doi.org/10.1159/000054716
2. Ahima, R.S., Flier, J.S., 2000. Leptin. Annu Rev Physiol 62, 413–437. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.413
3. Ahrens, K., Mumford, S.L., Schliep, K.C., Kissell, K.A., Perkins, N.J., Wactawski-Wende, J., Schisterman, E.F., 2014. Serum leptin levels and reproductive function during the menstrual cycle. Am J Obstet Gynecol 210, 248.e1-248.e9. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.11.009
4. Albuquerque, D., Nóbrega, C., Manco, L., Padez, C., 2017. The contribution of genetics and environment to obesity. Br Med Bull 123, 159–173. https://doi.org/10.1093/bmb/ldx022
5. Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E., 2017. Triglyceride metabolism in the liver. Compr Physiol 8, 1–8. https://doi.org/10.1002/cphy.c170012
6. Andreoli, M.F., Donato, J., Cakir, I., Perello, M., 2019. Leptin resensitisation: a reversion of leptin-resistant states. J Endocrinol 241, R81–R96. https://doi.org/10.1530/JOE-18-0606
7. Antoniou-Tsigkos, A., Macut, D., Mastorakos, G., 2018. Physiopathology, Diagnosis, and Treatment of Secondary Female Hypogonadism, in: Casanueva, F.F., Ghigo, E. (Eds.), Hypothalamic-Pituitary Diseases, Endocrinology. Springer International Publishing, Cham, pp. 247–287. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44444-4_9
8. Appelgren, L.E., 1969. Histochemical demonstration of drug interference with progesterone synthesis. J Reprod Fertil 19, 185–186. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0190185
9. Aune, D., Saugstad, O.D., Henriksen, T., Tonstad, S., 2014. Maternal body mass index and the risk of fetal death, stillbirth, and infant death: a systematic review and meta-analysis. JAMA 311, 1536–1546. https://doi.org/10.1001/jama.2014.2269
10. Bagdade, J.D., Bierman, E.L., Porte, D., 1967. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. J Clin Invest 46, 1549–1557. https://doi.org/10.1172/JCI105646
11. Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H., Myers, M.G., 2000. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. J Biol Chem 275, 14563–14572. https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14563
12. Barak, V., Yanai, P., Treves, A.J., Roisman, I., Simon, A., Laufer, N., 1992. Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. Fertil Steril 58, 719–725. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55318-7
13. Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W.K., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., Neel, B.G., Schwartz, M.W., Myers, M.G., 2003. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. Nature 421, 856–859. https://doi.org/10.1038/nature01388

14. Battegay, E.J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E.H., Pech, M., 1994. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. J Cell Biol 125, 917–928. https://doi.org/10.1083/jcb.125.4.917
15. Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D., Bloom, S.R., 2002. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. Nature 418, 650–654. https://doi.org/10.1038/nature00887
16. Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., Latz, E., 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol 183, 787–791. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363
17. Berthoud, H.-R., 2002. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. Neurosci Biobehav Rev 26, 393–428. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(02)00014-3
18. Bertolin, K., Murphy, B.D., 2014. 7 - Reproductive Tract Changes During the Mouse Estrous Cycle, in: Croy, B.A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. (Eds.), The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy. Academic Press, Boston, pp. 85–94. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394445-0.00007-2
19. Bilbao, M.G., Di Yorio, M.P., Faletti, A.G., 2013. Different levels of leptin regulate different target enzymes involved in progesterone synthesis. Fertil Steril 99, 1460–1466. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.014
20. Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., 2014. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. Hepatology 59, 713–723. https://doi.org/10.1002/hep.26672
21. Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J.D., Flier, J.S., 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. J Biol Chem 274, 30059–30065. https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.30059
22. Boini, K.M., Xia, M., Koka, S., Gehr, T.W., Li, P.-L., 2016. Instigation of NLRP3 inflammasome activation and glomerular injury in mice on the high fat diet: role of acid sphingomyelinase gene. Oncotarget 7, 19031–19044. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8023
23. Brandys, N., Chadzińska, M., 2021. Polaryzacja mikrogleju i makrofagów w wybranych chorobach degeneracyjnych i zapalnych układu nerwowego. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 75, 904–922. https://doi.org/10.2478/ahem-2021-0014
24. Brannian, J.D., Hansen, K.A., 2002. Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes. Semin Reprod Med 20, 103–112. https://doi.org/10.1055/s-2002-32501
25. Brännström, M., Wang, L., Norman, R.J., 1993. Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. Biol Reprod 48, 165–171. https://doi.org/10.1095/biolreprod48.1.165
26. Brewer, C.J., Balen, A.H., 2010. The adverse effects of obesity on conception and implantation. Reproduction 140, 347–364. https://doi.org/10.1530/REP-09-0568
27. Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., Hobbs, H.H., 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. Hepatology 40, 1387–1395. https://doi.org/10.1002/hep.20466

28. Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q.-X., Halfmann, R., Chen, Z.J., 2014. Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. Cell 156, 1207–1222. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.063
29. Cai, Z., Huang, Y., He, B., 2022. New Insights into Adipose Tissue Macrophages in Obesity and Insulin Resistance. Cells 11, 1424. https://doi.org/10.3390/cells11091424
30. Cai, Z., Kwintkiewicz, J., Young, M.E., Stocco, C., 2007. Prostaglandin E2 Increases Cyp19 Expression in Rat Granulosa Cells: Implication of GATA-4. Mol Cell Endocrinol 263, 181–189. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.09.012
31. Carlberg, M., Nejaty, J., Fröysa, B., Guan, Y., Söder, O., Bergqvist, A., 2000. Elevated expression of tumour necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. Hum Reprod 15, 1250–1255. https://doi.org/10.1093/humrep/15.6.1250
32. Cella, F., Giordano, G., Cordera, R., 2000. Serum leptin concentrations during the menstrual cycle in normal-weight women: effects of an oral triphasic estrogen-progestin medication. Eur J Endocrinol 142, 174–178. https://doi.org/10.1530/eje.0.1420174
33. Chehab, F.F., Lim, M.E., Lu, R., 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nat Genet 12, 318–320. https://doi.org/10.1038/ng0396-318
34. Chiazza, F., Couturier-Maillard, A., Benetti, E., Mastrocola, R., Nigro, D., Cutrin, J.C., Serpe, L., Aragno, M., Fantozzi, R., Ryffel, B., Thiemermann, C., Collino, M., 2016. Targeting the NLRP3 Inflammasome to Reduce Diet-Induced Metabolic Abnormalities in Mice. Mol Med 21, 1025–1037. https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00104
35. Childs, G.V., Odle, A.K., MacNicol, M.C., MacNicol, A.M., 2021. The Importance of Leptin to Reproduction. Endocrinology 162, bqaa204. https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa204
36. Chu, S.Y., Kim, S.Y., Lau, J., Schmid, C.H., Dietz, P.M., Callaghan, W.M., Curtis, K.M., 2007. Maternal obesity and risk of stillbirth: a metaanalysis. Am J Obstet Gynecol 197, 223–228. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.03.027
37. Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougnères, P., Lebouc, Y., Froguel, P., Guy-Grand, B., 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature 392, 398–401. https://doi.org/10.1038/32911
38. Considine, R.V., Considine, E.L., Williams, C.J., Nyce, M.R., Magosin, S.A., Bauer, T.L., Rosato, E.L., Colberg, J., Caro, J.F., 1995. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. J Clin Invest 95, 2986–2988. https://doi.org/10.1172/JCI118007
39. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med 334, 292–295. https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503
40. Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., Szabo, G., 2011. Fatty Acid and Endotoxin Activate Inflammasomes in Mouse Hepatocytes that Release Danger Signals to Stimulate Immune Cells. Hepatology 54, 133–144. https://doi.org/10.1002/hep.24341

41. Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S., 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes 50, 1714–1719. https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1714
42. Davis, B.K., Wen, H., Ting, J.P.-Y., 2011. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. Annu Rev Immunol 29, 707–735. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405
43. De Nardo, D., Latz, E., 2011. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. Trends Immunol 32, 373–379. https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.004
44. Di, A., Xiong, S., Ye, Z., Malireddi, R.K.S., Kometani, S., Zhong, M., Mittal, M., Hong, Z., Kanneganti, T.-D., Rehman, J., Malik, A.B., 2018. The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. Immunity 49, 56-65.e4. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.032
45. Dinarello, C.A., 2018. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunol Rev 281, 8–27. https://doi.org/10.1111/imr.12621
46. Dinarello, C.A., 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood 117, 3720–3732. https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417
47. Dinarello, C.A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol 27, 519–550. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612
48. Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29, 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635
49. Domingo-Fernández, R., Coll, R.C., Kearney, J., Breit, S., O'Neill, L.A.J., 2017. The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1β transcription and activate the NLRP3 inflammasome. J Biol Chem 292, 12077–12087. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.797126
50. Donado, C.A., Cao, A.B., Simmons, D.P., Croker, B.A., Brennan, P.J., Brenner, M.B., 2020. A Two-Cell Model for IL-1β Release Mediated by Death-Receptor Signaling. Cell Rep 31, 107466. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.030
51. Donato, J., Frazão, R., Elias, C.F., 2010. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. Arq Bras Endocrinol Metabol 54, 591–602. https://doi.org/10.1590/s0004-27302010000700002
52. Donesky, B.W., Dias de Moura, M., Tedeschi, C., Hurwitz, A., Adashi, E.Y., Payne, D.W., 1998. Interleukin-1beta inhibits steroidogenic bioactivity in cultured rat ovarian granulosa cells by stimulation of progesterone degradation and inhibition of estrogen formation. Biol Reprod 58, 1108–1116. https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1108
53. Du, H., Taylor, H.S., 2016. The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility. Cold Spring Harb Perspect Med 6, a023002. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023002
54. Duffaut, C., Galitzky, J., Lafontan, M., Bouloumié, A., 2009. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. Biochem Biophys Res Commun 384, 482–485. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.002
55. Duncan, J.A., Bergstralh, D.T., Wang, Y., Willingham, S.B., Ye, Z., Zimmermann, A.G., Ting, J.P.-Y., 2007. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is

an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 8041–8046. https://doi.org/10.1073/pnas.0611496104
56. Durinck, S., Spellman, P.T., Birney, E., Huber, W., 2009. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. Nat Protoc 4, 1184–1191. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97
57. Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M., 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. Endocr Rev 30, 624–712. https://doi.org/10.1210/er.2009-0012
58. Elliott, E.I., Miller, A.N., Banoth, B., Iyer, S.S., Stotland, A., Weiss, J.P., Gottlieb, R.A., Sutterwala, F.S., Cassel, S.L., 2018. Cutting Edge: Mitochondrial Assembly of the NLRP3 Inflammasome Complex Is Initiated at Priming. J Immunol 200, 3047–3052. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701723
59. Elmquist, J.K., Bjørbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., Saper, C.B., 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. J Comp Neurol 395, 535–547.
60. Enriori, P.J., Evans, A.E., Sinnayah, P., Cowley, M.A., 2006. Leptin resistance and obesity. Obesity (Silver Spring) 14 Suppl 5, 254S-258S. https://doi.org/10.1038/oby.2006.319
61. Erickson, G.F., Magoffin, D.A., Dyer, C.A., Hofeditz, C., 1985. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. Endocr Rev 6, 371–399. https://doi.org/10.1210/edrv-6-3-371
62. Evans, G.S., Gibson, D.F., Roberts, S.A., Hind, T.M., Potten, C.S., 1990. Proliferative changes in the genital tissue of female mice during the oestrous cycle. Cell Tissue Kinet 23, 619–635. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1990.tb01350.x
63. Evavold, C.L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., Kagan, J.C., 2018. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. Immunity 48, 35-44.e6. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013
64. Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., Cone, R.D., 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. Nature 385, 165–168. https://doi.org/10.1038/385165a0
65. Fantuzzi, G., Faggioni, R., 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. Journal of Leukocyte Biology 68, 437–446. https://doi.org/10.1189/jlb.68.4.437
66. Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S.H., Lank, E.J., Cheetham, T., O'Rahilly, S., 2003. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. N Engl J Med 348, 1085–1095. https://doi.org/10.1056/NEJMoa022050
67. Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.P., Nguyen, T.N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K.J., Schwall, R.H., 1998. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. Nat Med 4, 336–340. https://doi.org/10.1038/nm0398-336
68. Field, S.L., Dasgupta, T., Cummings, M., Orsi, N.M., 2014. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. Molecular Reproduction and Development 81, 284–314. https://doi.org/10.1002/mrd.22285
69. Fischer-Posovszky, P., von Schnurbein, J., Moepps, B., Lahr, G., Strauss, G., Barth, T.F., Kassubek, J., Mühleder, H., Möller, P., Debatin, K.-M., Gierschik, P., Wabitsch, M., 2010. A new missense mutation in the leptin gene causes mild obesity and hypogonadism without affecting T cell responsiveness. J Clin Endocrinol Metab 95, 2836–2840. https://doi.org/10.1210/jc.2009-2466

70. Fu, S., Liu, L., Han, L., Yu, Y., 2017. Leptin promotes IL‑18 secretion by activating the NLRP3 inflammasome in RAW 264.7 cells. Mol Med Rep 16, 9770–9776. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7797
71. Gabay, C., Lamacchia, C., Palmer, G., 2010. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. Nat Rev Rheumatol 6, 232–241. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.4
72. Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Rapino, F., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., Graf, T., Hornung, V., 2016. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. Immunity 44, 833–846. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012
73. Galvão, A., Henriques, S., Pestka, D., Lukasik, K., Skarzynski, D., Mateus, L.M., Ferreira-Dias, G.M.L., 2012. Equine luteal function regulation may depend on the interaction between cytokines and vascular endothelial growth factor: an in vitro study. Biol Reprod 86, 187. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097147
74. Galvão, A., Tramontano, A., Rebordão, M.R., Amaral, A., Bravo, P.P., Szóstek, A., Skarzynski, D., Mollo, A., Ferreira-Dias, G., 2014. Opposing Roles of Leptin and Ghrelin in the Equine Corpus Luteum Regulation: An In Vitro Study. Mediators of Inflammation 2014, e682193. https://doi.org/10.1155/2014/682193
75. Gao, Q., Wolfgang, M.J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T.L., Shulman, G.I., Fu, X.-Y., 2004. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 4661–4666. https://doi.org/10.1073/pnas.0303992101
76. Garris, D.R., 2004. Ovarian hypercytolipidemia induced by obese (ob/ob) and diabetes (db/db) mutations: basis of female reproductive tract involution II. Tissue Cell 36, 157–169. https://doi.org/10.1016/j.tice.2004.01.001
77. Gavello, D., Carbone, E., Carabelli, V., 2016. Leptin-mediated ion channel regulation: PI3K pathways, physiological role, and therapeutic potential. Channels (Austin) 10, 282–296. https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1164373
78. Ge, J., Li, C., Sun, H., Xin, Y., Zhu, S., Liu, Y., Tang, S., Han, L., Huang, Z., Wang, Q., 2021. Telomere Dysfunction in Oocytes and Embryos From Obese Mice. Frontiers in Cell and Developmental Biology 9.
79. Gibbs, J., Young, R.C., Smith, G.P., 1973. Cholecystokinin decreases food intake in rats. J Comp Physiol Psychol 84, 488–495. https://doi.org/10.1037/h0034870
80. Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., Cinti, S., 2014. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. Eur J Endocrinol 170, R159-171. https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945
81. Gonzalez, M.B., Lane, M., Knight, E.J., Robker, R.L., 2018. Inflammatory markers in human follicular fluid correlate with lipid levels and Body Mass Index. J Reprod Immunol 130, 25–29. https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.08.005
82. Góralska, M., Majewska-Szczepanik, M., Szczepanik, M., 2015. Mechanizmy immunologiczne towarzyszące otyłości i ich rola w zaburzeniach metabolizmu. Postepy Hig Med Dosw 69, 1384–1404.
83. Gottschall, P.E., Katsuura, G., Hoffmann, S.T., Arimura, A., 1988. Interleukin 1: an inhibitor of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. FASEB J 2, 2492–2496. https://doi.org/10.1096/fasebj.2.9.3131173
84. Green, J.P., Yu, S., Martín-Sánchez, F., Pelegrin, P., Lopez-Castejon, G., Lawrence, C.B., Brough, D., 2018. Chloride regulates dynamic NLRP3-dependent ASC oligomerization and inflammasome priming. Proc Natl Acad Sci U S A 115, E9371–E9380. https://doi.org/10.1073/pnas.1812744115

85. Groß, C.J., Mishra, R., Schneider, K.S., Médard, G., Wettmarshausen, J., Dittlein, D.C., Shi, H., Gorka, O., Koenig, P.-A., Fromm, S., Magnani, G., Ćiković, T., Hartjes, L., Smollich, J., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., Schmidt-Supprian, M., Schuster, M., Schroder, K., Broz, P., Traidl-Hoffmann, C., Beutler, B., Kuster, B., Ruland, J., Schneider, S., Perocchi, F., Groß, O., 2016. K+ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. Immunity 45, 761–773. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.010
86. Gu, Z., 2022. ComplexHeatmap: Make Complex Heatmaps. https://doi.org/10.18129/B9.bioc.ComplexHeatmap
87. Guo, C., Chi, Z., Jiang, D., Xu, T., Yu, W., Wang, Z., Chen, S., Zhang, L., Liu, Q., Guo, X., Zhang, X., Li, W., Lu, L., Wu, Y., Song, B.-L., Wang, D., 2018. Cholesterol Homeostatic Regulator SCAP-SREBP2 Integrates NLRP3 Inflammasome Activation and Cholesterol Biosynthetic Signaling in Macrophages. Immunity 49, 842-856.e7. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.021
88. Guo, Q.-J., Shan, J., Xu, Y.-F., Hu, Y.-Y., Huo, C.-L., Song, J.-Y., Wang, C.-Q., Zhou, H., Yu, C.-Q., Huang, Q., 2020. Pioglitazone Metformin Complex Improves Polycystic Ovary Syndrome Comorbid Psychological Distress via Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation: A Prospective Clinical Study. Mediators Inflamm 2020, 3050487. https://doi.org/10.1155/2020/3050487
89. Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., Schwartz, M.W., 1998. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. Nat Neurosci 1, 271–272. https://doi.org/10.1038/1082
90. Hasegawa, A., Mochida, K., Inoue, H., Noda, Y., Endo, T., Watanabe, G., Ogura, A., 2016. High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization1. Biology of Reproduction 94. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134023
91. Hausman, G.J., Barb, C.R., Lents, C.A., 2012. Leptin and reproductive function. Biochimie 94, 2075–2081. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.022
92. Hawkins, S.M., Matzuk, M.M., 2008. The menstrual cycle: basic biology. Ann N Y Acad Sci 1135, 10–18. https://doi.org/10.1196/annals.1429.018
93. He, Y., Hara, H., Núñez, G., 2016a. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. Trends in Biochemical Sciences 41, 1012–1021. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002
94. He, Y., Hua, R., Li, B., Gu, H., Sun, Y., Li, Z., 2020. Loss of FBP1 promotes proliferation, migration, and invasion by regulating fatty acid metabolism in esophageal squamous cell carcinoma. Aging (Albany NY) 13, 4986–4998. https://doi.org/10.18632/aging.103916
95. He, Y., Zeng, M.Y., Yang, D., Motro, B., Núñez, G., 2016b. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. Nature 530, 354–357. https://doi.org/10.1038/nature16959
96. Hekerman, P., Zeidler, J., Bamberg-Lemper, S., Knobelspies, H., Lavens, D., Tavernier, J., Joost, H.-G., Becker, W., 2005. Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. FEBS J 272, 109–119. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04391.x
97. Hileman, S.M., Pierroz, D.D., Masuzaki, H., Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Banks, W.A., Flier, J.S., 2002. Characterizaton of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models

of obesity. Endocrinology 143, 775–783. https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8669
98. Hill, D.A., Lim, H.-W., Kim, Y.H., Ho, W.Y., Foong, Y.H., Nelson, V.L., Nguyen, H.C.B., Chegireddy, K., Kim, J., Habertheuer, A., Vallabhajosyula, P., Kambayashi, T., Won, K.-J., Lazar, M.A., 2018. Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. Proc Natl Acad Sci U S A 115, E5096–E5105. https://doi.org/10.1073/pnas.1802611115
99. Hirshfield, A.N., 1991a. Development of follicles in the mammalian ovary. Int Rev Cytol 124, 43–101. https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61524-7
100. Hirshfield, A.N., 1991b. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. Biol Reprod 44, 1157–1162. https://doi.org/10.1095/biolreprod44.6.1157
101. Hohos, N.M., Cho, K.J., Swindle, D.C., Skaznik-Wikiel, M.E., 2018. High-fat diet exposure, regardless of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal ovulatory function. Mol Cell Endocrinol 470, 199–207. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.10.016
102. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259, 87–91. https://doi.org/10.1126/science.7678183
103. Hou, Y.-J., Zhu, C.-C., Duan, X., Liu, H.-L., Wang, Q., Sun, S.-C., 2016. Both diet and gene mutation induced obesity affect oocyte quality in mice. Sci Rep 6, 18858. https://doi.org/10.1038/srep18858
104. Hu, S., Gao, S., Zhu, J., Gan, X., Chen, X., He, H., Liang, L., Hu, B., Hu, J., Liu, H., Han, C., Kang, B., Xia, L., Wang, J., 2020. Differential actions of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1 and 2 in regulating lipid metabolism and progesterone secretion of goose granulosa cells. J Steroid Biochem Mol Biol 202, 105721. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105721
105. Huang-Doran, I., Franks, S., 2016. Genetic Rodent Models of Obesity-Associated Ovarian Dysfunction and Subfertility: Insights into Polycystic Ovary Syndrome. Frontiers in Endocrinology 7.
106. Hurwitz, A., Finci-Yeheskel, Z., Dushnik, M., Milwidsky, A., Shimonovitz, S., Yagel, S., Adashi, E.Y., Mayer, M., 1995. Interleukin-1-mediated regulation of plasminogen activation in pregnant mare serum gonadotropin-primed rat granulosa cells is independent of prostaglandin production. J Soc Gynecol Investig 2, 691–699. https://doi.org/10.1016/1071-5576(95)00024-9
107. Hurwitz, A., Ricciarelli, E., Botero, L., Rohan, R.M., Hernandez, E.R., Adashi, E.Y., 1991. Endocrine- and autocrine-mediated regulation of rat ovarian (theca-interstitial) interleukin-1 beta gene expression: gonadotropin-dependent preovulatory acquisition. Endocrinology 129, 3427–3429. https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3427
108. Ichinohe, T., Yamazaki, T., Koshiba, T., Yanagi, Y., 2013. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 17963–17968. https://doi.org/10.1073/pnas.1312571110
109. Iikuni, N., Lam, Q.L.K., Lu, L., Matarese, G., La Cava, A., 2008. Leptin and Inflammation. Curr Immunol Rev 4, 70–79. https://doi.org/10.2174/157339508784325046
110. Iyer, S.S., He, Q., Janczy, J.R., Elliott, E.I., Zhong, Z., Olivier, A.K., Sadler, J.J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S.C., Nauseef, W.M., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S., 2013. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3

inflammasome activation. Immunity 39, 311–323. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001
111. Izquierdo, A.G., Crujeiras, A.B., Casanueva, F.F., Carreira, M.C., 2019. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? Nutrients 11, 2704. https://doi.org/10.3390/nu11112704
112. Jain, A., Irizarry-Caro, R.A., McDaniel, M.M., Chawla, A.S., Carroll, K.R., Overcast, G.R., Philip, N.H., Oberst, A., Chervonsky, A.V., Katz, J.D., Pasare, C., 2020. T cells instruct myeloid cells to produce inflammasome-independent IL-1β and cause autoimmunity. Nat Immunol 21, 65–74. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0559-y
113. Jaitin, D.A., Adlung, L., Thaiss, C.A., Weiner, A., Li, B., Descamps, H., Lundgren, P., Bleriot, C., Liu, Z., Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., David, E., Zmora, N., Eldar, S.M., Lubezky, N., Shibolet, O., Hill, D.A., Lazar, M.A., Colonna, M., Ginhoux, F., Shapiro, H., Elinav, E., Amit, I., 2019. Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. Cell 178, 686-698.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.054
114. José de los Santos, M., Anderson, D.J., Racowsky, C., Simón, C., Hill, J.A., 1998. Expression of Interleukin-1 System Genes in Human Gametes1. Biology of Reproduction 59, 1419–1424. https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1419
115. Jungheim, E.S., Schoeller, E.L., Marquard, K.L., Louden, E.D., Schaffer, J.E., Moley, K.H., 2010. Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. Endocrinology 151, 4039–4046. https://doi.org/10.1210/en.2010-0098
116. Karakji, E.G., Tsang, B.K., 1995. Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: influence of interleukin-1 beta and ovarian follicular development. Biol Reprod 53, 1302–1310. https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1302
117. Karlsson, C., Lindell, K., Svensson, E., Bergh, C., Lind, P., Billig, H., Carlsson, L.M.S., Carlsson, B., 1997. Expression of Functional Leptin Receptors in the Human Ovary1. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 82, 4144–4148. https://doi.org/10.1210/jcem.82.12.4446
118. Katsnelson, M.A., Rucker, L.G., Russo, H.M., Dubyak, G.R., 2015. K+ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca2+ signaling. J Immunol 194, 3937–3952. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402658
119. Kayagaki, N., Stowe, I.B., Lee, B.L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q.T., Liu, P.S., Lill, J.R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W.P., Snipas, S.J., Salvesen, G.S., Morris, L.X., Fitzgerald, L., Zhang, Y., Bertram, E.M., Goodnow, C.C., Dixit, V.M., 2015. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. Nature 526, 666–671. https://doi.org/10.1038/nature15541
120. Kenealy, S., Creagh, E.M., 2018. Autoinflammatory Diseases: Consequences of Uncontrolled Inflammasome Activation. EMJ 3, 106–113. https://doi.org/10.33590/emjallergyimmunol/10314723
121. Kitaoka, M., Kojima, I., Ogata, E., 1988. Activin-A: a modulator of multiple types of anterior pituitary cells. Biochem Biophys Res Commun 157, 48–54. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)80009-3
122. Knight, P.G., Satchell, L., Glister, C., 2012. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. Mol Cell Endocrinol 359, 53–65. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.024

123. Kol, S., Ruutiainen-Altman, K., Scherzer, W.J., Ben-Shlomo, I., Ando, M., Rohan, R.M., Adashi, E.Y., 1999. The rat intraovarian interleukin (IL)-1 system: cellular localization, cyclic variation and hormonal regulation of IL-1beta and of the type I and type II IL-1 receptors. Mol Cell Endocrinol 149, 115–128. https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00260-3
124. Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., Grüters, A., 1998. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat Genet 19, 155–157. https://doi.org/10.1038/509
125. Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N., Matzuk, M.M., 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nat Genet 15, 201–204. https://doi.org/10.1038/ng0297-201
126. Kyrönlahti, A., Vetter, M., Euler, R., Bielinska, M., Jay, P.Y., Anttonen, M., Heikinheimo, M., Wilson, D.B., 2011. GATA4 deficiency impairs ovarian function in adult mice. Biol Reprod 84, 1033–1044. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086850
127. La Cava, A., 2017. Leptin in inflammation and autoimmunity. Cytokine 98, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.10.011
128. Lee, G.-S., Subramanian, N., Kim, A.I., Aksentijevich, I., Goldbach-Mansky, R., Sacks, D.B., Germain, R.N., Kastner, D.L., Chae, J.J., 2012. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP. Nature 492, 123–127. https://doi.org/10.1038/nature11588
129. Lemasters, J.J., Theruvath, T.P., Zhong, Z., Nieminen, A.-L., 2009. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. Biochim Biophys Acta 1787, 1395–1401. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2009.06.009
130. Li, Z., Ceccarini, G., Eisenstein, M., Tan, K., Friedman, J.M., 2013. Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. Molecular Metabolism 2, 364–375. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.07.007
131. Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics 30, 923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656
132. Lin, Q., Poon, S.L., Chen, J., Cheng, L., HoYuen, B., Leung, P.C., 2009. Leptin interferes with 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells. Reproductive Biology and Endocrinology 7, 115. https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-115
133. Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clément, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z., Doria, A., Libby, P., Blumberg, R.S., Kahn, B.B., Hotamisligil, G.S., Shi, G.-P., 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. Nat Med 15, 940–945. https://doi.org/10.1038/nm.1994
134. Liu, T., Zhao, H., Wang, J., Shu, X., Gao, Y., Mu, X., Gao, F., Liu, H., 2017. The role of fructose-1,6-bisphosphatase 1 in abnormal development of ovarian follicles caused by high testosterone concentration. Mol Med Rep 16, 6489–6498. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7463
135. Long, X., Yang, Q., Qian, J., Yao, H., Yan, R., Cheng, X., Zhang, Q., Gu, C., Gao, F., Wang, H., Zhang, L., Guo, F., 2022. Obesity modulates cell-cell interactions during ovarian folliculogenesis. iScience 25. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103627

136. Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8
137. Lu, A., Magupalli, V., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M.K., Vos, M., Schröder, G.F., Fitzgerald, K.A., Wu, H., Egelman, E.H., 2014. Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-dependent Inflammasomes. Cell 156, 1193–1206. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.008
138. Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. J Clin Invest 117, 175–184. https://doi.org/10.1172/JCI29881
139. Luo, Y., Qiao, X., Ma, Y., Deng, H., Xu, C.C., Xu, L., 2021. Irisin deletion induces a decrease in growth and fertility in mice. Reprod Biol Endocrinol 19, 22. https://doi.org/10.1186/s12958-021-00702-7
140. Machelon, V., Nome, F., Durand-Gasselin, I., Emilie, D., 1995. Macrophage and granulosa interleukin-1 beta mRNA in human ovulatory follicles. Hum Reprod 10, 2198–2203. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136268
141. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med 1, 1155–1161. https://doi.org/10.1038/nm1195-1155
142. Magoffin, D.A., 2005. Ovarian theca cell. Int J Biochem Cell Biol 37, 1344–1349. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.016
143. Mangan, M.S.J., Olhava, E.J., Roush, W.R., Seidel, H.M., Glick, G.D., Latz, E., 2018. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov 17, 588–606. https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97
144. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., Hill, R.A., 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. Int J Obes Relat Metab Disord 26, 1407–1433. https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802142
145. Mark, A.L., Correia, M.L.G., Rahmouni, K., Haynes, W.G., 2002. Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. J Hypertens 20, 1245–1250. https://doi.org/10.1097/00004872-200207000-00001
146. Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal 17, 10–12. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200
147. Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J., 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell 10, 417–426. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00599-3
148. McLean, A.C., Valenzuela, N., Fai, S., Bennett, S.A.L., 2012. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. J Vis Exp 4389. https://doi.org/10.3791/4389
149. Mihm, M., Gangooly, S., Muttukrishna, S., 2011. The normal menstrual cycle in women. Anim Reprod Sci 124, 229–236. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.030
150. Minge, C.E., Bennett, B.D., Norman, R.J., Robker, R.L., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. Endocrinology 149, 2646–2656. https://doi.org/10.1210/en.2007-1570

151. Miyado, M., Miyado, K., Katsumi, M., Saito, K., Nakamura, A., Shihara, D., Ogata, T., Fukami, M., 2015. Parturition failure in mice lacking Mamld1. Sci Rep 5, 14705. https://doi.org/10.1038/srep14705
152. Montgomery, V., Loutradis, D., Tulchinsky, D., Kiessling, A., 1988. FSH-induced ovulation in intact and hypophysectomized mice. J Reprod Fertil 84, 1–6. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840001
153. Morgan, D.A., Thedens, D.R., Weiss, R., Rahmouni, K., 2008. Mechanisms mediating renal sympathetic activation to leptin in obesity. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 295, R1730-1736. https://doi.org/10.1152/ajpregu.90324.2008
154. Moslehi, N., Shab-Bidar, S., Ramezani Tehrani, F., Mirmiran, P., Azizi, F., 2018. Is ovarian reserve associated with body mass index and obesity in reproductive aged women? A meta-analysis. Menopause 25, 1046–1055. https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001116
155. Mraz, M., Haluzik, M., 2014. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. Journal of Endocrinology 222, R113–R127. https://doi.org/10.1530/JOE-14-0283
156. Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M., Horng, T., 2012. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 11282–11287. https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109
157. Myers, M.G., Heymsfield, S.B., Haft, C., Kahn, B.B., Laughlin, M., Leibel, R.L., Tschöp, M.H., Yanovski, J.A., 2012. Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. Cell Metab 15, 150–156. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.002
158. Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A.K., Lee, S.-J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., Fitzgerald, K.A., Ryter, S.W., Choi, A.M.K., 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol 12, 222–230. https://doi.org/10.1038/ni.1980
159. Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K.-I., Kaneko, S., 2009. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. J Biol Chem 284, 14809–14818. https://doi.org/10.1074/jbc.M901488200
160. Navarro-Pando, J.M., Alcocer-Gómez, E., Castejón-Vega, B., Navarro-Villarán, E., Condés-Hervás, M., Mundi-Roldan, M., Muntané, J., Pérez-Pulido, A.J., Bullon, P., Wang, C., Hoffman, H.M., Sanz, A., Mbalaviele, G., Ryffel, B., Cordero, M.D., 2021. Inhibition of the NLRP3 inflammasome prevents ovarian aging. Science Advances 7, eabc7409. https://doi.org/10.1126/sciadv.abc7409
161. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2017. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet 390, 2627–2642. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3
162. Nippoldt, T.B., Reame, N.E., Kelch, R.P., Marshall, J.C., 1989. The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 69, 67–76. https://doi.org/10.1210/jcem-69-1-67

163. Niringiyumukiza, J.D., Cai, H., Xiang, W., 2018. Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation. Reproductive Biology and Endocrinology 16, 43. https://doi.org/10.1186/s12958-018-0359-5
164. Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., Nagai, R., 2009. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat Med 15, 914–920. https://doi.org/10.1038/nm.1964
165. Nothnick, W.B., Pate, J.L., 1990. Interleukin-1 beta is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. Biol Reprod 43, 898–903. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.5.898
166. Nteeba, J., Ganesan, S., Keating, A.F., 2014. Progressive Obesity Alters Ovarian Folliculogenesis with Impacts on Pro-Inflammatory and Steroidogenic Signaling in Female Mice1. Biology of Reproduction 91. https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121343
167. Nteeba, J., Ortinau, L.C., Perfield, J.W., Keating, A.F., 2013. Diet-induced obesity alters immune cell infiltration and expression of inflammatory cytokine genes in mouse ovarian and peri-ovarian adipose depot tissues. Molecular Reproduction and Development 80, 948–958. https://doi.org/10.1002/mrd.22231
168. Orlowski, G.M., Colbert, J.D., Sharma, S., Bogyo, M., Robertson, S.A., Rock, K.L., 2015. Multiple Cathepsins Promote Pro-IL-1β Synthesis and NLRP3-Mediated IL-1β Activation. J Immunol 195, 1685–1697. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500509
169. Pantasri, T., Wu, L.L., Hull, M.L., Sullivan, T.R., Barry, M., Norman, R.J., Robker, R.L., 2015. Distinct localisation of lipids in the ovarian follicular environment. Reprod Fertil Dev 27, 593–601. https://doi.org/10.1071/RD14321
170. Park, S., Juliana, C., Hong, S., Datta, P., Hwang, I., Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Alnemri, E.S., 2013. The mitochondrial antiviral protein MAVS associates with NLRP3 and regulates its inflammasome activity. J Immunol 191, 4358–4366. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301170
171. Parkening, T.A., Collins, T.J., Smith, E.R., 1982. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. Neurobiol Aging 3, 31–35. https://doi.org/10.1016/0197-4580(82)90058-6
172. Pelegrin, P., Surprenant, A., 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J 25, 5071–5082. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378
173. Penzias, A.S., 2012. Recurrent IVF failure: other factors. Fertil Steril 97, 1033–1038. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.017
174. Pérez-Pérez, A., Sánchez-Jiménez, F., Maymó, J., Dueñas, J.L., Varone, C., Sánchez-Margalet, V., 2015. Role of leptin in female reproduction. Clin Chem Lab Med 53, 15–28. https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0387
175. Perregaux, D., Gabel, C.A., 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. J Biol Chem 269, 15195–15203.
176. Piccinni, M.-P., Vicenti, R., Logiodice, F., Fabbri, R., Kullolli, O., Pallecchi, M., Paradisi, R., Danza, G., Macciocca, M., Lombardelli, L., Seracchioli, R., 2021. Description of the Follicular Fluid Cytokine and Hormone Profiles in Human

Physiological Natural Cycles. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 106, e721–e738. https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa880
177. Picelli, S., Björklund, Å.K., Faridani, O.R., Sagasser, S., Winberg, G., Sandberg, R., 2013. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. Nat Methods 10, 1096–1098. https://doi.org/10.1038/nmeth.2639
178. Picelli, S., Faridani, O.R., Björklund, Å.K., Winberg, G., Sagasser, S., Sandberg, R., 2014. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat Protoc 9, 171–181. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.006
179. Pinkas, H., Fisch, B., Rozansky, G., Felz, C., Kessler-Icekson, G., Krissi, H., Nitke, S., Ao, A., Abir, R., 2008. Platelet-derived growth factors (PDGF-A and -B) and their receptors in human fetal and adult ovaries. Molecular Human Reproduction 14, 199–206. https://doi.org/10.1093/molehr/gan011
180. Poulsen, L. la C., Englund, A.L.M., Wissing, M.L.M., Yding Andersen, C., Borup, R., Grøndahl, M.L., 2019. Human granulosa cells function as innate immune cells executing an inflammatory reaction during ovulation: a microarray analysis. Mol Cell Endocrinol 486, 34–46. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.02.014
181. Pyrillou, K., Burzynski, L.C., Clarke, M.C.H., 2020. Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. Front. Immunol. 11. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613170
182. Quail, D.F., Dannenberg, A.J., 2019. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. Nat Rev Endocrinol 15, 139–154. https://doi.org/10.1038/s41574-018-0126-x
183. Raffan, E., Dennis, R.J., O'Donovan, C.J., Becker, J.M., Scott, R.A., Smith, S.P., Withers, D.J., Wood, C.J., Conci, E., Clements, D.N., Summers, K.M., German, A.J., Mellersh, C.S., Arendt, M.L., Iyemere, V.P., Withers, E., Söder, J., Wernersson, S., Andersson, G., Lindblad-Toh, K., Yeo, G.S.H., O'Rahilly, S., 2016. A Deletion in the Canine POMC Gene Is Associated with Weight and Appetite in Obesity-Prone Labrador Retriever Dogs. Cell Metab 23, 893–900. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.012
184. Rajendren, G., Gibson, M.J., 2001. A confocal microscopic study of synaptic inputs to gonadotropin-releasing hormone cells in mouse brain: regional differences and enhancement by estrogen. Neuroendocrinology 73, 84–90. https://doi.org/10.1159/000054624
185. Richards, J.S., Pangas, S.A., 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. J Clin Invest 120, 963–972. https://doi.org/10.1172/JCI41350
186. Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., Dekel, N.,2016. Ovarian Folliculogenesis. In: Piprek, R. (eds) Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. Results and Problems in Cell Differentiation, vol 58. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_7
187. Robertson, D.M., Klein, R., de Vos, F.L., McLachlan, R.I., Wettenhall, R.E., Hearn, M.T., Burger, H.G., de Kretser, D.M., 1987. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. Biochem Biophys Res Commun 149, 744–749. https://doi.org/10.1016/0006-291x(87)90430-x
188. Robinson, M.W., Harmon, C., O'Farrelly, C., 2016. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. Cell Mol Immunol 13, 267–276. https://doi.org/10.1038/cmi.2016.3

189. Robker, R.L., 2008. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. Pathophysiology 15, 115–121. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2008.04.004
190. Rostamtabar, M., Esmaeilzadeh, S., Karkhah, A., Amiri, M., Rahmani, A., Bakouei, F., Nouri, H.R., 2020. Elevated expression of IL-18 but not IL-1β gene is associated with NALP3 and AIM2 inflammasome in Polycystic Ovary Syndrome. Gene 731, 144352. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144352
191. Rudolph, M., Döcke, W.-D., Müller, A., Menning, A., Röse, L., Zollner, T.M., Gashaw, I., 2012. Induction of Overt Menstruation in Intact Mice. PLoS One 7, e32922. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032922
192. Ryan, N.K., Woodhouse, C.M., Van der Hoek, K.H., Gilchrist, R.B., Armstrong, D.T., Norman, R.J., 2002. Expression of Leptin and Its Receptor in the Murine Ovary: Possible Role in the Regulation of Oocyte Maturation1. Biology of Reproduction 66, 1548–1554. https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1548
193. Sahu, A., Kalra, P.S., Kalra, S.P., 1988. Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. Peptides 9, 83–86. https://doi.org/10.1016/0196-9781(88)90013-7
194. Salem, A.M., 2021. Variation of Leptin During Menstrual Cycle and Its Relation to the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) Axis: A Systematic Review. Int J Womens Health 13, 445–458. https://doi.org/10.2147/IJWH.S309299
195. Salmassi, A., Fattahi, A., Nouri, M., Hedderich, J., Schmutzler, A.G., 2017. Expression of mRNA and protein of IL-18 and its receptor in human follicular granulosa cells. J Endocrinol Invest 40, 447–454. https://doi.org/10.1007/s40618-016-0590-x
196. Sander, V.A., Facorro, G.B., Piehl, L., Rubín de Celis, E., Motta, A.B., 2009. Effect of DHEA and metformin on corpus luteum in mice. Reproduction 138, 571–579. https://doi.org/10.1530/REP-08-0325
197. Sarapik, A., Velthut, A., Haller-Kikkatalo, K., Faure, G.C., Béné, M.-C., de Carvalho Bittencourt, M., Massin, F., Uibo, R., Salumets, A., 2012. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. Clin Dev Immunol 2012, 606459. https://doi.org/10.1155/2012/606459
198. Sarkar, D.K., Chiappa, S.A., Fink, G., Sherwood, N.M., 1976. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. Nature 264, 461–463. https://doi.org/10.1038/264461a0
199. Savoy-Moore, R.T., Swartz, K.H., 1987. Several GnRH stimulation frequencies differentially release FSH and LH from isolated, perfused rat anterior pituitary cells. Adv Exp Med Biol 219, 641–645. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5395-9_35
200. Schmid-Burgk, J.L., Chauhan, D., Schmidt, T., Ebert, T.S., Reinhardt, J., Endl, E., Hornung, V., 2016. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. J Biol Chem 291, 103–109. https://doi.org/10.1074/jbc.C115.700492
201. Schmidt, F.I., Lu, A., Chen, J.W., Ruan, J., Tang, C., Wu, H., Ploegh, H.L., 2016. A single domain antibody fragment that recognizes the adaptor ASC defines the role of ASC domains in inflammasome assembly. J Exp Med 213, 771–790. https://doi.org/10.1084/jem.20151790
202. Schmidt, R.L., Lenz, L.L., 2012. Distinct Licensing of IL-18 and IL-1β Secretion in Response to NLRP3 Inflammasome Activation. PLOS ONE 7, e45186. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045186

203. Schwartz, M.W., Morton, G.J., 2002. Obesity: keeping hunger at bay. Nature 418, 595–597. https://doi.org/10.1038/418595a
204. Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., Baskin, D.G., 1997. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. Diabetes 46, 2119–2123. https://doi.org/10.2337/diab.46.12.2119
205. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. Nature 404, 661–671. https://doi.org/10.1038/35007534
206. Seo, S., Ju, S., Chung, H., Lee, D., Park, S., 2008. Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. Endocr J 55, 867–874. https://doi.org/10.1507/endocrj.k08e-091
207. Sermondade, N., Huberlant, S., Bourhis-Lefebvre, V., Arbo, E., Gallot, V., Colombani, M., Fréour, T., 2019. Female obesity is negatively associated with live birth rate following IVF: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update 25, 439–451. https://doi.org/10.1093/humupd/dmz011
208. Sharma, Y., Galvão, A.M., 2022. Maternal obesity and ovarian failure: is leptin the culprit? Anim Reprod 19, e20230007. https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0007
209. Shen, H.-R., Xu, X., Li, X.-L., 2021. Berberine exerts a protective effect on rats with polycystic ovary syndrome by inhibiting the inflammatory response and cell apoptosis. Reproductive Biology and Endocrinology 19, 3. https://doi.org/10.1186/s12958-020-00684-y
210. Shi, H., Wang, Y., Li, X., Zhan, X., Tang, M., Fina, M., Su, L., Pratt, D., Bu, C.H., Hildebrand, S., Lyon, S., Scott, L., Quan, J., Sun, Q., Russell, J., Arnett, S., Jurek, P., Chen, D., Kravchenko, V.V., Mathison, J.C., Moresco, E.M.Y., Monson, N.L., Ulevitch, R.J., Beutler, B., 2016. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. Nat Immunol 17, 250–258. https://doi.org/10.1038/ni.3333
211. Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., Shao, F., 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature 514, 187–192. https://doi.org/10.1038/nature13683
212. Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A.J., Vergnes, L., Ojcius, D.M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K.A., Underhill, D.M., Town, T., Arditi, M., 2012. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. Immunity 36, 401–414. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009
213. Si, C., Wang, N., Wang, M., Liu, Y., Niu, Z., Ding, Z., 2021. TMT-based proteomic and bioinformatic analyses of human granulosa cells from obese and normal-weight female subjects. Reproductive Biology and Endocrinology 19, 75. https://doi.org/10.1186/s12958-021-00760-x
214. Simón, C., Frances, A., Piquette, G., Polan, M.L., 1994. Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation, and luteinization. Biol Reprod 50, 449–457. https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.449
215. Sims, J.E., Smith, D.E., 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. Nat Rev Immunol 10, 89–102. https://doi.org/10.1038/nri2691
216. Skaznik-Wikiel, M.E., Swindle, D.C., Allshouse, A.A., Polotsky, A.J., McManaman, J.L., 2016. High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised

Ovarian Function Independent of Obesity in Mice. Biol Reprod 94, 108. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.137414
217. Sleer, L.S., Taylor, C.C., 2007. Cell-Type Localization of Platelet-Derived Growth Factors and Receptors in the Postnatal Rat Ovary and Follicle1. Biology of Reproduction 76, 379–390. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.046854
218. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150, 76–85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7
219. Snider, A.P., Wood, J.R., 2019. Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. Reproduction 158, R79–R90. https://doi.org/10.1530/REP-18-0583
220. Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., Leibowitz, S.F., 1986. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. Peptides 7, 1189–1192. https://doi.org/10.1016/0196-9781(86)90149-x
221. Stefanovic-Racic, M., Yang, X., Turner, M.S., Mantell, B.S., Stolz, D.B., Sumpter, T.L., Sipula, I.J., Dedousis, N., Scott, D.K., Morel, P.A., Thomson, A.W., O'Doherty, R.M., 2012. Dendritic cells promote macrophage infiltration and comprise a substantial proportion of obesity-associated increases in CD11c+ cells in adipose tissue and liver. Diabetes 61, 2330–2339. https://doi.org/10.2337/db11-1523
222. Stienstra, R., Tack, C.J., Kanneganti, T.-D., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., 2012. The inflammasome puts obesity in the danger zone. Cell Metab 15, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.011
223. Stienstra, R., van Diepen, J.A., Tack, C.J., Zaki, Md.H., van de Veerdonk, F.L., Perera, D., Neale, G.A., Hooiveld, G.J., Hijmans, A., Vroegrijk, I., van den Berg, S., Romijn, J., Rensen, P.C.N., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Kanneganti, T.-D., 2011. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 15324–15329. https://doi.org/10.1073/pnas.1100255108
224. Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G., 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. Endocr Rev 28, 117–149. https://doi.org/10.1210/er.2006-0022
225. Subramanian, N., Natarajan, K., Clatworthy, M.R., Wang, Z., Germain, R.N., 2013. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. Cell 153, 348–361. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.054
226. Sugawara, S., Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A., Hanzawa, K., Kumagai, K., Okamura, H., Takada, H., 2001. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. J Immunol 167, 6568–6575. https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6568
227. Suriano, F., Vieira-Silva, S., Falony, G., Roumain, M., Paquot, A., Pelicaen, R., Régnier, M., Delzenne, N.M., Raes, J., Muccioli, G.G., Van Hul, M., Cani, P.D., 2021. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. Microbiome 9, 147. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01097-8

228. Swanson, K.V., Deng, M., Ting, J.P.-Y., 2019. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol 19, 477–489. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0
229. Swinburn, B.A., Sacks, G., Hall, K.D., McPherson, K., Finegood, D.T., Moodie, M.L., Gortmaker, S.L., 2011. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. Lancet 378, 804–814. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1
230. Szabo, G., Petrasek, J., 2015. Inflammasome activation and function in liver disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 12, 387–400. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.94
231. Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Wool, E.A., Monroe, C.A., Tepper, R.I., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 83, 1263–1271. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90151-5
232. Traba, J., Sack, M.N., 2017. The role of caloric load and mitochondrial homeostasis in the regulation of the NLRP3 inflammasome. Cell Mol Life Sci 74, 1777–1791. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2431-7
233. Tsuji, Y., Adachi, S., Koyama, K., Tamaoki, T.H., Iemoto, A., Furuyama, J.-I., Tamaoki, T.H., Hasegawa, A., Furuyama, J.-I., Koyama, K., Tamaoki, T.H., Kashiwamura, S.-I., Ueda, H., Muranaka, J., Furuyama, J.-I., Okamura, H., 2001. Expression of Interleukin-18 and its Receptor in Mouse Ovary. American Journal of Reproductive Immunology 46, 349–357. https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2001.d01-23.x
234. Tups, A., 2009. Physiological models of leptin resistance. J Neuroendocrinol 21, 961–971. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01916.x
235. Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S., Guillemin, R., 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 8282–8286. https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8282
236. Uyar, A., Torrealday, S., Seli, E., 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. Fertil Steril 99, 979–997. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.129
237. Valckx, S.D., Arias-Alvarez, M., De Pauw, I., Fievez, V., Vlaeminck, B., Fransen, E., Bols, P.E., Leroy, J.L., 2014. Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. Reprod Biol Endocrinol 12, 13. https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-13
238. van den Hurk, R., Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology 63, 1717–1751. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005
239. van Herpen, N.A., Schrauwen-Hinderling, V.B., 2008. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. Physiol Behav 94, 231–241. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.049
240. Veliça, P., Davies, N.J., Rocha, P.P., Schrewe, H., Ride, J.P., Bunce, C.M., 2009. Lack of functional and expression homology between human and mouse aldo-keto reductase 1C enzymes: implications for modelling human cancers. Mol Cancer 8, 121. https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-121
241. Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L., Nelson, K.G., 1992. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle:

correlation with circulating estradiol and progesterone. Endocrinology 131, 1458–1466. https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1505477
242. Wang, F., Wang, S., Zhang, Z., Lin, Q., Liu, Y., Xiao, Y., Xiao, K., Wang, Z., 2017. Activation of NLRP3 inflammasome in the ovaries during the development and treatment of polycystic ovary syndrome. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 10, 5022–5030.
243. Wang, H., Cheng, Q., Li, X., Hu, F., Han, L., Zhang, H., Li, L., Ge, J., Ying, X., Guo, X., Wang, Q., 2018. Loss of TIGAR Induces Oxidative Stress and Meiotic Defects in Oocytes from Obese Mice. Mol Cell Proteomics 17, 1354–1364. https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000620
244. Wang, L.J., Brännström, M., Cui, K.H., Simula, A.P., Hart, R.P., Maddocks, S., Norman, R.J., 1997. Localisation of mRNA for interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the rat ovary. J Endocrinol 152, 11–17. https://doi.org/10.1677/joe.0.1520011
245. Wang, N., Luo, L.-L., Xu, J.-J., Xu, M.-Y., Zhang, X.-M., Zhou, X.-L., Liu, W.-J., Fu, Y.-C., 2014. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. Metabolism 63, 94–103. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.001
246. Wani, K., AlHarthi, H., Alghamdi, A., Sabico, S., Al-Daghri, N.M., 2021. Role of NLRP3 Inflammasome Activation in Obesity-Mediated Metabolic Disorders. Int J Environ Res Public Health 18. https://doi.org/10.3390/ijerph18020511
247. Wauman, J., Zabeau, L., Tavernier, J., 2017. The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected? Frontiers in Endocrinology 8.
248. Webber, J., 2003. Energy balance in obesity. Proc Nutr Soc 62, 539–543. https://doi.org/10.1079/pns2003256
249. Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T.-H., Brickey, W.J., Ting, J.P.-Y., 2011. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat Immunol 12, 408–415. https://doi.org/10.1038/ni.2022
250. Wickham, H., 2016. ggplot2, Use R! Springer International Publishing, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4
251. Wilding, M., Coppola, G., Dale, B., Di Matteo, L., 2009. Mitochondria and human preimplantation embryo development. Reproduction 137, 619–624. https://doi.org/10.1530/REP-08-0444
252. Wildt, L., Häusler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., Knobil, E., 1981. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. Endocrinology 109, 376–385. https://doi.org/10.1210/endo-109-2-376
253. Wolf, A.J., Reyes, C.N., Liang, W., Becker, C., Shimada, K., Wheeler, M.L., Cho, H.C., Popescu, N.I., Coggeshall, K.M., Arditi, M., Underhill, D.M., 2016. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. Cell 166, 624–636. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.076
254. Wołodko, K., Castillo-Fernandez, J., Kelsey, G., Galvão, A., 2021. Revisiting the Impact of Local Leptin Signaling in Folliculogenesis and Oocyte Maturation in Obese Mothers. Int J Mol Sci 22. https://doi.org/10.3390/ijms22084270
255. Wołodko, K., Walewska, E., Adamowski, M., Castillo-Fernandez, J., Kelsey, G., Galvão, A., 2020. Leptin Resistance in the Ovary of Obese Mice is Associated with Profound Changes in the Transcriptome of Cumulus Cells. Cell Physiol Biochem 54, 417–437. https://doi.org/10.33594/000000228

256. Woodruff, T.K., Shea, L.D., 2007. The Role of the Extracellular Matrix in Ovarian Follicle Development. Reprod Sci 14, 6–10. https://doi.org/10.1177/1933719107309818
257. Woods, S.C., D'Alessio, D.A., 2008. Central control of body weight and appetite. J Clin Endocrinol Metab 93, S37-50. https://doi.org/10.1210/jc.2008-1630
258. Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X.D., Feng, L., Garcia, G.E., Perrard, J.L., Sweeney, J.F., Peterson, L.E., Chan, L., Smith, C.W., Ballantyne, C.M., 2007. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. Circulation 115, 1029–1038. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638379
259. Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., Spiegelman, B.M., 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. Cell 150, 366–376. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016
260. Wu, L.L.-Y., Dunning, K.R., Yang, X., Russell, D.L., Lane, M., Norman, R.J., Robker, R.L., 2010. High-Fat Diet Causes Lipotoxicity Responses in Cumulus–Oocyte Complexes and Decreased Fertilization Rates. Endocrinology 151, 5438–5445. https://doi.org/10.1210/en.2010-0551
261. Wulff, C., Wilson, H., Largue, P., Duncan, W.C., Armstrong, D.G., Fraser, H.M., 2000. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. J Clin Endocrinol Metab 85, 4302–4309. https://doi.org/10.1210/jcem.85.11.6942
262. Xie, F., Anderson, C.L., Timme, K.R., Kurz, S.G., Fernando, S.C., Wood, J.R., 2016. Obesity-Dependent Increases in Oocyte mRNAs Are Associated With Increases in Proinflammatory Signaling and Gut Microbial Abundance of Lachnospiraceae in Female Mice. Endocrinology 157, 1630–1643. https://doi.org/10.1210/en.2015-1851
263. Xu, L., Wang, W., Zhang, X., Ke, H., Qin, Y., You, L., Li, W., Lu, G., Chan, W.-Y., Leung, P.C.K., Zhao, S., Chen, Z.-J., 2019. Palmitic acid causes insulin resistance in granulosa cells via activation of JNK. Journal of Molecular Endocrinology 62, 197–206. https://doi.org/10.1530/JME-18-0214
264. Yang, C.-C., Wu, C.-H., Lin, T.-C., Cheng, Y.-N., Chang, C.-S., Lee, K.-T., Tsai, P.-J., Tsai, Y.-S., 2021. Inhibitory effect of PPARγ on NLRP3 inflammasome activation. Theranostics 11, 2424–2441. https://doi.org/10.7150/thno.46873
265. Yang, D., He, Y., Muñoz-Planillo, R., Liu, Q., Núñez, G., 2015. Caspase-11 Requires the Pannexin-1 Channel and the Purinergic P2X7 Pore to Mediate Pyroptosis and Endotoxic Shock. Immunity 43, 923–932. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.009
266. Yang, X., Wu, L.L., Chura, L.R., Liang, X., Lane, M., Norman, R.J., Robker, R.L., 2012. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. Fertil Steril 97, 1438–1443. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.034
267. Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H., Shi, F., 2019. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. Cell Death Dis 10, 128. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1413-8
268. Yaron, J.R., Gangaraju, S., Rao, M.Y., Kong, X., Zhang, L., Su, F., Tian, Y., Glenn, H.L., Meldrum, D.R., 2015. K(+) regulates Ca(2+) to drive inflammasome

signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. Cell Death Dis 6, e1954. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.277
269. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., He, Q.-Y., 2012. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. OMICS 16, 284–287. https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118
270. Yu, G., Wang, L.-G., Yan, G.-R., He, Q.-Y., 2015. DOSE: an R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis. Bioinformatics 31, 608–609. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu684
271. Zabolotny, J.M., Bence-Hanulec, K.K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Elmquist, J.K., Tartaglia, L.A., Kahn, B.B., Neel, B.G., 2002. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. Dev Cell 2, 489–495. https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00148-x
272. Zhang, H., Wang, X., Xu, J., Zhu, Y., Chen, X., Hu, Y., 2020. IL-18 and IL-18 binding protein concentration in ovarian follicular fluid of women with unexplained infertility to PCOS during in vitro fertilization. J Reprod Immunol 138, 103083. https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103083
273. Zhang, L., Song, K., Zhou, L., Xie, Z., Zhou, P., Zhao, Y., Han, Y., Xu, X., Li, P., 2015. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1 (HS3ST3B1) promotes angiogenesis and proliferation by induction of VEGF in acute myeloid leukemia cells. J Cell Biochem 116, 1101–1112. https://doi.org/10.1002/jcb.25066
274. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372, 425–432. https://doi.org/10.1038/372425a0
275. Zhang, H. yuan, Zhu, F. fan, Zhu, Y. jun, Hu, Y. jing, Chen, X., 2021. Effects of IL-18 on the proliferation and steroidogenesis of bovine theca cells: Possible roles in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. Journal of Cellular and Molecular Medicine 25, 1128–1139. https://doi.org/10.1111/jcmm.16179
276. Zhang, Z., Wang, F., Zhang, Y., 2019. Expression and Contribution of NLRP3 Inflammasome During the Follicular Development Induced by PMSG. Front. Cell Dev. Biol. 7. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00256
277. Zhao, J., Li, Y., 2012. Adenosine triphosphate content in human unfertilized oocytes, undivided zygotes and embryos unsuitable for transfer or cryopreservation. J Int Med Res 40, 734–739. https://doi.org/10.1177/147323001204000238
278. Zhao, S., Fernald, R.D., 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. J Comput Biol 12, 1047–1064. https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047
279. Zhu, Q., Kanneganti, T.-D., 2017. Cutting Edge: Distinct Regulatory Mechanisms Control Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-1β. J.I. 198, 4210–4215. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700352
280. Zolti, M., Ben-Rafael, Z., Meirom, R., Shemesh, M., Bider, D., Mashiach, S., Apte, R.N., 1991. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. Fertil Steril 56, 265–272. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)54483-5

8. SUPLEMENTY

Tab. S1A. Masa ciała myszy w modelach otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

wiek myszy (tygodnie)	**Masa ciała [g]**														
CD															
8	18,3	19,3	19,2	18,8	19,6	19,42	18,83	17,58	18,58						
12	19,7	20,3	20,7	21,05	20,4	21,16	20,72	19,05	21,15	20,89	19,85	20,94	22,95	22,1	
16	20,88	22,21	22,03	23,13	23,55	22,11	21,29	20,75	21,86	20,8	24,55	26,04	25,4	21,5	30,01
HFD															
8	20,76	19	19,61	19,27	18,8	20,05	18,5								
12	24,97	23,54	27,69	24,68	21,93	23,71	21,21	29,5	28,3	23,67	24,69	23,8			
16	38,74	34,46	42,93	37,91	33,21	35,93	29,38	37,5	38,2	38,7	43,4	35,8	40,23	39,6	
db/+															
8	22,06					25,79	23,48	20,53		19,91	19,54				
10	24,51	23,26	20	26,43	23,49	23,09	20,45	21,53	20,8	22,35	22,24				
12	26,41						24,64	22,84	17,82	23,95	23,15				
db/db															
8	43,85	47,24			39,12	41,53	37,42	40,75	41,63	38,92					
10	44,48	51,54	43,72	46,5	45,13	52,13	47,56	49,66	46,93	48,23					
12	48,24	54,73				55,86	52,3	55,42	52,22	53,82					
ob/+															
8	23,77	20,79	19,73	20,8		23,15	21,23	21,45	19,7	19,14	19,45				
10	25,23	22,92	21,35	21,96	20,32	24,28			21,71	21,43	20,7				
12	26,13	23,35	21,49	21,5	21,05		26,43	23,49	21,49	21,25	20,88				

ob/ob															
8	30,67	39,24	35,03	45,83	46,77	42,42	38,22	39,94							
10	37,33	45,16	41,91	53,84			44,18	46,8	43,81	46,6					
12	41,34		49,73				47,76	52,51	49,51	51,68					
K															
8	18,42	19,05	20,41	20,46	21,08	21,56	21,36	21,18	21,84	22,16	23,74	25,79			
10	18,05	18,63				21,67		21,21	22,4		22,35	24,98			
L															
8	18,44	20,52	20,79	20,5	21,49	21,22	22,07	21,72	23,25	24,75	25,3	21,52			
10				17,04		18,58	18,62		19,75	20,84	22,3	18,99			

Tab. S1B. Masa tkanki tłuszczowej myszy w modelach otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

wiek myszy (tygodnie)	**Masa tkanki tłuszczowej [g]**											
CD												
8	3,16	3,32	3,14	2,96	3,31	2,96	2,88	2,83	3,26			
12	3,23	2,88	3,35	3,53	3,3	3,33	3,1	3,02	3,28			
16	3,81	3,66	3,65	4,2	4,31	3,38	3,49	3,55	3,5			
HFD												
8	4,19	3,69	3,95	3,4	3,53	3,15	3,36					
12	5,97	5,26	7,68	6,19	3,82	4,3	3,85					
16	15,22	12,44	18,77	15,19	11,06	12,91	9,34					
db/+												
8	4,53					4,2	0,84	1,65		0,93	0,53	
10	5,41	5,11	4,44	6,47	5,48	3,23	2,65	3,52	1,66	1,45	1,14	

12	6,99						3,66	2,58	1,57	3,08	1,82	
db/db												
8	22,12	23,93			22,07	24,65	24,58	24,64	22,57	25,03		
10	22,23	26,51	20,67	22,91	28,05	36,43	34,55	34,07	32,02	33,21		
12	24,91	27,67				42,9	40,07	39,35	37,33	38,18		
ob/+												
8	5,66	4,34	3,78	4,77		5,54	3,98	4,15	4,36	3,48	4,33	
10	5,82	4,6	4,28	4,87	3,71	5,46			5,02	4,7	4,31	
12	6,33	5,02	4,59	4,3	4,03		6,47	5,48	4,73	3,89	4,65	
ob/ob												
8	13,72	18,07	17,73	23,57	21,1	20,53	17,29	17,39				
10	18,25	21,69	21,73	28,62			21,22	23,04	25,95	28,37		
12	21,6		26,05				24,42	27,36	31,48	34,81		
K												
8	3,6	3,95	4,33	4,32	4,18	4,99	4,46	4,22	4,28	3,92	5,12	6,14
10	3,42	3,76				5,35		3,96	4,65		4,4	5,18
L												
8	4,22	4,37	3,56	4,71	4,7	3,98	4,6	4,99	5,03	5,64	5,54	4,24
10				2,65		2,51	3,06		2,75	3,74	3,48	3,19

Tab. S1C. Masa tkanki beztłuszczowej myszy w modelach otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

wiek myszy (tygodnie)	Masa tkanki beztłuszczowej [g]											
CD												
8	14,99	15,31	15,8	15,22	15,92	15,6	15,37	14,05	14,82			
12	16,07	16,46	16,56	17,07	16,45	16,26	16,6	14,9	16,87			
16	16,58	18,06	18,09	18,54	18,97	17,31	16,41	16,05	17,25			
HFD												
8	16,18	15,06	14,77	15,54	15,03	16,15	14,71					
12	17,68	17,03	18,78	16,98	16,4	17,92	15,75					
16	21,22	19,65	21,92	20,22	19,9	20,83	18,01					
db/+												
8	17,47					17,3	19,56	15,12		17,01	16,77	
10	18,18	17,86	15,71	19,08	17,13	16,44	16,8	16,83	15,81	17,8	17,96	
12	18,95						17,22	17,2	15,89	16,98	17,24	
db/db												
8	21,98	22,84			13,02	12,81	12,76	12,76	13,17	13,4		
10	21,83	23,79	22,03	22,68	13,41	12,03	10,56	12,2	12,44	12,05		
12	23,91	25,43				10,66	9,93	12,99	12,15	12,29		
ob/+												
8	17,68	15,97	15,73	16,25		17,71	16,54	16,92	15,58	15,51	15,69	
10	18,51	16,87	16,45	16,44	15,91	18,47			16,62	17,43	16,39	
12	19,6	17,73	16,27	17,12	17,07		19,08	17,13	15,87	16,56	15,67	
ob/ob												
8	16,34	19,94	17,46	22,35	24,51	21,22	20,52	21,65				
10	18,11	21,7	19,65	24,14			22,15	23,2	14,05	14,49		

12	19,46		23,53				23,06	24,23	14,6	13,94		
K												
8	14,3	14,5	15,55	15,83	15,93	16,35	16,52	16,26	16,75	17,38	18,31	19,74
10	13,89	13,95				15,31		17,06	16,81		16,71	19,17
L												
8	13,97	16,02	17,08	15,9	16,69	16,75	16,98	16,35	17,93	18,85	19,61	15,92
10				14,59		15,5	15,29		16,38	16,5	18,41	15,45

Tab. S1D. Wskaźnik otłuszczenia myszy w modelach otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity - DIO), otyłości uwarunkowanej genetycznie (myszy *db/db* i *ob/ob*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii.

wiek myszy (tygodnie)	**Wskaźnik otłuszczenia (%)**											
CD												
8	0,2108	0,2169	0,1987	0,1945	0,2079	0,1897	0,1874	0,2014	0,22			
12	0,201	0,175	0,2023	0,2068	0,2006	0,2048	0,1867	0,2027	0,1944			
16	0,2298	0,2027	0,2018	0,2265	0,2272	0,1953	0,2127	0,2212	0,2029			
HFD												
8	0,259	0,245	0,2674	0,2188	0,2349	0,195	0,2284					
12	0,3377	0,3089	0,4089	0,3645	0,2329	0,24	0,2444					
16	0,7172	0,6331	0,8563	0,7512	0,5558	0,6198	0,5186					
***db*/+**												
8	0,26					0,24	0,04	0,11		0,05	0,03	
10	0,29758	0,286114	0,282623	0,339099	0,319907	0,196472	0,157738	0,20915	0,104997	0,081461	0,063474	
12	0,368865						0,212544	0,15	0,098804	0,18139	0,105568	

db/db												
8	1,01	1,05			1,7	1,92	1,93	1,93	1,71	1,87		
10	1,018323	1,114334	0,938266	1,010141	2,091723	3,028263	3,27178	2,792623	2,573955	2,756017		
12	1,041824	1,088085				4,02439	4,035247	3,029253	3,072428	3,106591		
ob/+												
8	0,32	0,27	0,24	0,29		0,31	0,24	0,25	0,28	0,22	0,28	
10	0,314425	0,272673	0,260182	0,296229	0,233187	0,295615			0,302046	0,26965	0,262965	
12	0,322959	0,283136	0,282114	0,251168	0,236087		0,339099	0,319907	0,298047	0,234903	0,296745	
ob/ob												
8	0,84	0,91	1,02	1,054586	0,86	0,97	0,84	0,8				
10	1,007731	0,999539	1,105852	1,185584			0,958014	0,993103	1,846975	1,957902		
12	1,109969		1,107097				1,058977	1,129179	2,156164	2,497131		
K												
8	0,251748	0,272414	0,278457	0,2729	0,262398	0,305199	0,269976	0,259533	0,255522	0,225547	0,279629	0,311044
10	0,24622	0,269534				0,349445		0,232122	0,276621		0,263315	0,270214
L												
8	0,302076	0,272784	0,208431	0,296226	0,281606	0,237612	0,270907	0,305199	0,280535	0,299204	0,282509	0,266332
10				0,181631		0,161935	0,200131		0,167888	0,226667	0,189028	0,206472

Tab. S2. Całkowita liczba genów ulegających ekspresji w komórkach ziarnistych myszy *db/db* i *ob/ob*.

Liczba	*db/db*				*db/+*				*ob/ob*			*ob/+*		
	HOM_24	HOM_53	HOM_68	HOM_81	het_37	het_51	het_69	het_75	obHOM_106	obHOM_41	obHOM_50	obHet_60	obHet_65	obHet_68
odczytów przed kontrolą jakości	3 845 985	3 589 840	3 633 762	4 845 675	5 529 703	7 812 580	5 476 399	6 084 373	8 211 155	10 808 094	12 981 061	7 140 677	5 835 327	6 978 296
odczytów po kontroli jakości	3 841 593	3 583 983	3 628 381	4 839 234	5 523 334	7 804 266	5 471 247	6 078 578	8 201 205	10 789 585	12 965 990	7 132 892	5 829 010	6 967 367
zmapowanych odczytów	3 685 421	3 412 094	3 461 133	4 643 785	5 301 625	7 530 891	5 276 233	5 862 320	7 908 511	10 264 757	12 447 133	6 866 241	5 609 814	6 311 970
odczytów wiążących się do unikatowej lokalizacji	3 203 046	3 035 654	3 094 281	4 108 802	4 637 125	6 604 891	4 601 872	5 121 822	6 955 557	9 106 651	10 829 835	6 065 975	4 972 433	5 383 134
genów (całkowita), która wykazała ekspresję w próbce	18 004	18 522	17 934	18 557	18 094	20 381	19 333	19 189	21 500	21 042	23 270	20 386	20 741	22 249

Tab. S3. Geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w komórkach ziarnistych myszy *db/db*.

ENSEMBL	Symbol	Pełna nazwa genu	Krotność zmiany (log2FC)	Skorygowana wartość p
ENSMUSG00000021319	*Sfrp4*	secreted frizzled-related protein 4	-4.20205948144076	8.25321246199928e-16
ENSMUSG00000054843	*Atrnl1*	attractin like 1	1.00378032656027	8.74661006649093e-6
ENSMUSG00000028036	*Ptgfr*	prostaglandin F receptor	-6.13060392391517	0.00122242937577882
ENSMUSG00000060126	*Tpt1*	tumor protein, translationally-controlled 1	-0.863742342415908	0.00122242937577882

ENSMUSG00000024620	*Pdgfrb*	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	1.92261197314742	0.0050504330875672104
ENSMUSG00000069755	*3110053B16Rik*	RIKEN cDNA 3110053B16 gene	-0.998898805017649	0.0050504330875672104
ENSMUSG00000008575	*Nfib*	nuclear factor I/B	2.42919805104558	0.00505447662777905
ENSMUSG00000027966	*Col11a1*	collagen, type XI, alpha 1	1.5157159134052	0.00505447662777905
ENSMUSG00000021214	*Akr1c18*	aldo-keto reductase family 1, member C18	-4.15704240031944	0.0054577710649987
ENSMUSG00000030342	*Cd9*	CD9 antigen	0.935171137643978	0.0113676376189019
ENSMUSG00000027018	*Hat1*	histone aminotransferase 1	-0.54452267406245	0.0226671708429132
ENSMUSG00000064370	*CYTB*	cytochrome b	-0.752443476282165	0.0226671708429132
ENSMUSG00000026914	*Psmd14*	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	-0.50538022796181	0.0259251414990768
ENSMUSG00000021520	*Uqcrb*	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	-0.747711704746089	0.0298606582067733
ENSMUSG00000026035	*Ppil3*	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 3	-0.787501443918108	0.0298606582067733
ENSMUSG00000031422	*Morf4l2*	mortality factor 4 like 2	-0.637983712145669	0.0298606582067733
ENSMUSG00000032012	*Nectin1*	nectin cell adhesion molecule 1	1.13199803832116	0.0298606582067733
ENSMUSG00000040774	*Cept1*	choline/ethanolaminephosphotransferase 1	-0.862096786744987	0.0298606582067733
ENSMUSG00000056383	*AI987944*	expressed sequence AI987944	-1.21923855264901	0.0298606582067733
ENSMUSG00000069793	*Slfn9*	schlafen 9	-0.917337121074133	0.0298606582067733
ENSMUSG00000070407	*Hs3st3b1*	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	-1.38578497426076	0.0298606582067733
ENSMUSG00000028419	*Chmp5*	charged multivesicular body protein 5	-0.716724882082005	0.0312633607057295
ENSMUSG00000029718	*Pcolce*	procollagen C-endopeptidase enhancer protein	1.56696273850767	0.0325042460549285
ENSMUSG00000066613	*Zfp932*	zinc finger protein 932	-0.767298858169647	0.0326625074524128
ENSMUSG00000024146	*Cript*	cysteine-rich PDZ-binding protein	-0.662018548626214	0.0336575316980535
ENSMUSG00000051159	*Cited1*	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	-1.75476724171036	0.0336575316980535
ENSMUSG00000069727	*Zfp975*	zinc finger protein 975	-1.08493573012268	0.0336575316980535
ENSMUSG00000028719	*Cmpk1*	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1	-0.757693075218479	0.0360613368525675
ENSMUSG00000047466	*8030462N17Rik*	RIKEN cDNA 8030462N17 gene	0.833243885863234	0.0360613368525675
ENSMUSG00000074863	*Platr25*	pluripotency associated transcript 25	-0.827091605371482	0.0384860698140813

ENSMUSG00000071014	*Ndufb6*	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B6	-0.653324677148515	0.0404097169087222
ENSMUSG00000021714	*Cenpk*	centromere protein K	-0.748344314634942	0.0410576541363939
ENSMUSG00000023919	*Cenpq*	centromere protein Q	-0.738468307170815	0.0410576541363939
ENSMUSG00000044646	*Zbtb7c*	zinc finger and BTB domain containing 7C	1.31429922871226	0.0410576541363939
ENSMUSG00000070493	*Chchd2*	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	-0.483148211441694	0.0410576541363939
ENSMUSG00000069733	*Ube2u*	ubiquitin-conjugating enzyme E2U (putative)	-2.75354239595636	0.0426074779246064
ENSMUSG00000096696	*Zfp960*	zinc finger protein 960	-1.30270871365499	0.0426074779246064
ENSMUSG00000034450	*Gulo*	gulonolactone (L-) oxidase	0.836993885648038	0.0445642475701208
ENSMUSG00000090553	*Snrpe*	small nuclear ribonucleoprotein E	-0.672525994872106	0.0478488487231906
ENSMUSG00000028005	*Gucy1b1*	guanylate cyclase 1, soluble, beta 1	-1.40850852006267	0.0487667927300237
ENSMUSG00000030022	*Adamts9*	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9	1.03307708353775	0.0487667927300237
ENSMUSG00000038156	*Spon1*	spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein	-1.24360029871069	0.0487667927300237
ENSMUSG00000027248	*Pdia3*	protein disulfide isomerase associated 3	-0.608960215915886	0.0489868927336407
ENSMUSG00000021213	*Akr1c13*	aldo-keto reductase family 1, member C13	-3.14049615564954	0.0497956090971143

Tab. S4. Geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w komórkach ziarnistych myszy o*b/ob*.

ENSEMBL	Symbol	Pełna nazwa genu	Krotność zmiany (log2FC)	Skorygowana wartość p
ENSMUSG00000032224	*Fam81a*	family with sequence similarity 81, member A	1.76888285417868	4.53255138743934e-7
ENSMUSG00000009628	*Tex15*	testis expressed gene 15	2.13784752353808	5.69322078579449e-6
ENSMUSG00000026640	*Plxna2*	plexin A2	-1.89988379047171	2.51690751619449e-5
ENSMUSG00000021364	*Elovl2*	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 2	-1.7351489241598	4.58763383946684e-5
ENSMUSG00000032083	*Apoa1*	apolipoprotein A-I	-1.72562823376825	1.400741191193e-4
ENSMUSG00000025889	*Snca*	synuclein, alpha	-3.14106501740975	3.5929601603628e-4

ENSMUSG00000032380	*Dapk2*	death-associated protein kinase 2	-2.99419571945575	5.57462013591177e-4
ENSMUSG00000038244	*Mical2*	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	-2.16602409051929	0.0019061709026498
ENSMUSG00000057457	*Phex*	phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	2.15297641450778	0.00195342917881186
ENSMUSG00000031503	*Col4a2*	collagen, type IV, alpha 2	-3.62564906829922	0.00220693574130171
ENSMUSG00000004633	*Chn2*	chimerin 2	-1.19250512922898	0.00279313678824944
ENSMUSG00000028063	*Lmna*	lamin A	-1.13800968434466	0.00279313678824944
ENSMUSG00000031529	*Tnks*	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	0.849231741641428	0.00279313678824944
ENSMUSG00000032649	*Colgalt2*	collagen beta(1-O)galactosyltransferase 2	2.05981868587487	0.00279313678824944
ENSMUSG00000036856	*Wnt4*	wingless-type MMTV integration site family, member 4	-2.7187721516521	0.00280211291491156
ENSMUSG00000059248	*Septin9*	septin 9	-1.55244075489951	0.00406520228300202
ENSMUSG00000042155	*Klhl23*	kelch-like 23	1.43588007367128	0.00449692014853761
ENSMUSG00000042846	*Lrrtm3*	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3	2.60023427268167	0.00449692014853761
ENSMUSG00000060935	*Tmem263*	transmembrane protein 263	1.23879701286781	0.00449692014853761
ENSMUSG00000072763	*5430403G16Rik*	RIKEN cDNA 5430403G16 gene	1.54349193977167	0.00449692014853761
ENSMUSG00000020099	*Unc5b*	unc-5 netrin receptor B	-2.71902546560456	0.00522124013213997
ENSMUSG00000041408	*Wapl*	WAPL cohesin release factor	1.02802878020282	0.00581483886014016
ENSMUSG00000055430	*Nap1l5*	nucleosome assembly protein 1-like 5	1.39377625656591	0.00585915473079491
ENSMUSG00000021214	*Akr1c18*	aldo-keto reductase family 1, member C18	-4.17954576817626	0.00933421322498486
ENSMUSG00000047547	*Cltb*	clathrin, light polypeptide (Lcb)	-1.54394269245681	0.00933421322498486
ENSMUSG00000038576	*Susd4*	sushi domain containing 4	-1.20922465531317	0.00976813283696206
ENSMUSG00000050953	*Gja1*	gap junction protein, alpha 1	0.857188164836525	0.00998070541187138
ENSMUSG00000057880	*Abat*	4-aminobutyrate aminotransferase	-1.37765368950629	0.00998070541187138
ENSMUSG00000032366	*Tpm1*	tropomyosin 1, alpha	-1.16253726235159	0.0105600912855497
ENSMUSG00000055917	*Zfp277*	zinc finger protein 277	0.868775141195383	0.0114088913657587
ENSMUSG00000035133	*Arhgap5*	Rho GTPase activating protein 5	1.36935447449299	0.0115850210705737
ENSMUSG00000030096	*Slc6a6*	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	1.58438285221504	0.0117012617371034

ENSMUSG00000029231	*Pdgfra*	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	-1.82154156214946	0.012429319600221
ENSMUSG00000074733	*Zfp950*	zinc finger protein 950	0.852632857679657	0.0140127115909917
ENSMUSG00000025608	*Podxl*	podocalyxin-like	-3.74266563690963	0.0150817488578197
ENSMUSG00000027416	*Otor*	otoraplin	2.1240464426962	0.0154360588196069
ENSMUSG00000048388	*Fam171b*	family with sequence similarity 171, member B	2.04965177418974	0.0154726884186786
ENSMUSG00000022122	*Ednrb*	endothelin receptor type B	2.90689820627906	0.0155953744175838
ENSMUSG00000024480	*Ap3s1*	adaptor-related protein complex 3, sigma 1 subunit	0.862275006598739	0.0155953744175838
ENSMUSG00000070407	*Hs3st3b1*	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1	-2.78711917787641	0.0155953744175838
ENSMUSG00000040690	*Col16a1*	collagen, type XVI, alpha 1	-2.90023858897408	0.0164951895204665
ENSMUSG00000073821	*NA*	NA	0.935318826704843	0.0167960420630613
ENSMUSG00000027326	*Knl1*	kinetochore scaffold 1	1.24599528099056	0.0188066051696202
ENSMUSG00000029335	*Bmp3*	bone morphogenetic protein 3	1.78979305756128	0.0215242492418122
ENSMUSG00000032097	*Ddx6*	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	1.51135931773226	0.0215297946285411
ENSMUSG00000038677	*Scube3*	signal peptide, CUB domain, EGF-like 3	-1.18968168772895	0.0215297946285411
ENSMUSG00000049225	*Pdp1*	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1	-1.30618096386287	0.0215297946285411
ENSMUSG00000022484	*Hoxc10*	homeobox C10	-5.84444053994039	0.021694277548843
ENSMUSG00000018593	*Sparc*	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	-1.78429138886398	0.0258943892186262
ENSMUSG00000035840	*Lysmd3*	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 3	1.0060804399104	0.0284173708475012
ENSMUSG00000022378	*Cyrib*	CYFIP related Rac1 interactor B	0.770279298840529	0.0297332480870036
ENSMUSG00000033578	*Tmem35a*	transmembrane protein 35A	-1.46058331826933	0.0297332480870036
ENSMUSG00000042035	*Igsf3*	immunoglobulin superfamily, member 3	2.12691270911997	0.0297332480870036
ENSMUSG00000051079	*Rgs13*	regulator of G-protein signaling 13	1.96427594968312	0.0297332480870036
ENSMUSG00000040212	*Emp3*	epithelial membrane protein 3	-1.61433011893614	0.0335847749643426
ENSMUSG00000073411	*H2-D1*	histocompatibility 2, D region locus 1	1.29044093888739	0.0335847749643426
ENSMUSG00000032221	*Mns1*	meiosis-specific nuclear structural protein 1	-1.20645517980524	0.0342462237329259
ENSMUSG00000067336	*Bmpr2*	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	1.3727926689821	0.0354643839477505

ENSMUSG00000020154	*Ptprb*	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B	-2.88586282767633	0.0355690897314722
ENSMUSG00000021589	*Rhobtb3*	Rho-related BTB domain containing 3	0.874328080450103	0.0355690897314722
ENSMUSG00000021614	*Vcan*	versican	-0.846439291480286	0.0355690897314722
ENSMUSG00000033082	*Clec1a*	C-type lectin domain family 1, member a	2.46892729600212	0.0355690897314722
ENSMUSG00000068122	*Agtr2*	angiotensin II receptor, type 2	-2.75619592498036	0.0355690897314722
ENSMUSG00000018217	*Pmp22*	peripheral myelin protein 22	-1.93939847702488	0.0382341422443402
ENSMUSG00000033543	*Gtf2a2*	general transcription factor II A, 2	0.828482478835745	0.0383247421355777
ENSMUSG00000036202	*Rif1*	replication timing regulatory factor 1	0.738252855209218	0.0383247421355777
ENSMUSG00000027698	*Nceh1*	neutral cholesterol ester hydrolase 1	0.928827609084914	0.0390277492372487
ENSMUSG00000048915	*Efna5*	ephrin A5	1.8689650356631	0.0419808473630063
ENSMUSG00000058056	*Palld*	palladin, cytoskeletal associated protein	-2.00700812417271	0.0419808473630063
ENSMUSG00000030772	*Dkk3*	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3	1.25587057837867	0.0452324539568834
ENSMUSG00000022871	*Fetub*	fetuin beta	1.49880509435851	0.0459831814736267
ENSMUSG00000117284	*Gm7072*	predicted gene 7072	0.928349470711673	0.0473531812662753
ENSMUSG00000034610	*Tut4*	terminal uridylyl transferase 4	0.835101352591769	0.0476588151355584
ENSMUSG00000042499	*Hoxd11*	homeobox D11	-4.39053518227072	0.0476588151355584
ENSMUSG00000038732	*Mboat1*	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	1.04635675811731	0.0477149102899769
ENSMUSG00000014164	*Klhl3*	kelch-like 3	-1.60396702096325	0.049766310164486
ENSMUSG00000025529	*Zfp711*	zinc finger protein 711	1.16534175176124	0.049766310164486
ENSMUSG00000030747	*Dgat2*	diacylglycerol O-acyltransferase 2	1.69059176784492	0.049766310164486
ENSMUSG00000031375	*Bgn*	biglycan	-2.39123504887814	0.049766310164486
ENSMUSG00000033792	*Atp7a*	ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide	0.793532941065467	0.049766310164486
ENSMUSG00000040118	*Cacna2d1*	calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1	0.912579206765957	0.049766310164486
ENSMUSG00000069805	*Fbp1*	fructose bisphosphatase 1	1.20130907792304	0.049766310164486

Tab. S5. Analiza funkcjonalna genów o obniżonej ekspresji w komórkach ziarnistych myszy *db/db*.

Nr	Numer identyfikacyjny kategorii GO	Kategoria GO	Opis	Skorygowana wartość p	Liczba genów o zróżnicowanej ekspresji zaklasyfikowanych do danego procesu	Lista genów
1	GO:0019748	BP	secondary metabolic process	0.00354094560168153	2	*Akr1c18, Cited1*
2	GO:0072088	BP	nephron epithelium morphogenesis	0.00635738927295424	2	*Cited1, Hs3st3b1*
3	GO:0072028	BP	nephron morphogenesis	0.00641229480142737	2	*Cited1, Hs3st3b1*
4	GO:0060993	BP	kidney morphogenesis	0.00835302501451898	2	*Cited1, Hs3st3b1*
5	GO:0072009	BP	nephron epithelium development	0.0103983942838485	2	*Cited1, Hs3st3b1*
6	GO:0072073	BP	kidney epithelium development	0.0159408882614046	2	*Cited1, Hs3st3b1*
7	GO:0030856	BP	regulation of epithelial cell differentiation	0.0159408882614046	2	*Sfrp4, Cited1*
8	GO:0072006	BP	nephron development	0.0159408882614046	2	*Cited1, Hs3st3b1*
9	GO:0071560	BP	cellular response to transforming growth factor beta stimulus	0.0295001586200273	2	*Akr1c18, Cited1*
10	GO:0071559	BP	response to transforming growth factor beta	0.0295098177014112	2	*Akr1c18, Cited1*
11	GO:0019932	BP	second-messenger-mediated signaling	0.0363220762844822	2	*Gucy1b1, Ptgfr*
12	GO:0001822	BP	kidney development	0.0363220762844822	2	*Cited1, Hs3st3b1*
13	GO:0008202	BP	steroid metabolic process	0.0363220762844822	2	*Akr1c13, Akr1c18*
14	GO:0072001	BP	renal system development	0.0363220762844822	2	*Cited1, Hs3st3b1*
15	GO:0032496	BP	response to lipopolysaccharide	0.0363220762844822	2	*Ptgfr, Cited1*
16	GO:0001655	BP	urogenital system development	0.0363220762844822	2	*Cited1, Hs3st3b1*
17	GO:0007178	BP	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	0.0363220762844822	2	*Sfrp4, Cited1*

18	GO:0002237	BP	response to molecule of bacterial origin	0.0378673871231603	2	*Ptgfr, Cited1*
19	GO:0007567	BP	parturition	0.0310983474113685	1	*Akr1c18*
20	GO:0003337	BP	mesenchymal to epithelial transition involved in metanephros morphogenesis	0.0312137524993497	1	*Cited1*
21	GO:0006182	BP	cGMP biosynthetic process	0.0312137524993497	1	*Gucy1b1*
22	GO:0042447	BP	hormone catabolic process	0.0312137524993497	1	*Akr1c18*
23	GO:0042182	BP	ketone catabolic process	0.0353848869495768	1	*Akr1c18*
24	GO:0071379	BP	cellular response to prostaglandin stimulus	0.0353848869495768	1	*Ptgfr*
25	GO:0072283	BP	metanephric renal vesicle morphogenesis	0.0353848869495768	1	*Cited1*
26	GO:0099550	BP	trans-synaptic signaling, modulating synaptic transmission	0.0353848869495768	1	*Gucy1b1*
27	GO:0046068	BP	cGMP metabolic process	0.0363220762844822	1	*Gucy1b1*
28	GO:2000696	BP	regulation of epithelial cell differentiation involved in kidney development	0.0363220762844822	1	*Cited1*
29	GO:0016137	BP	glycoside metabolic process	0.0363220762844822	1	*Akr1c18*
30	GO:0072077	BP	renal vesicle morphogenesis	0.0363220762844822	1	*Cited1*
31	GO:0042448	BP	progesterone metabolic process	0.0363220762844822	1	*Akr1c18*
32	GO:0055062	BP	phosphate ion homeostasis	0.0363220762844822	1	*Sfrp4*
33	GO:0060231	BP	mesenchymal to epithelial transition	0.0363220762844822	1	*Cited1*
34	GO:0060712	BP	spongiotrophoblast layer development	0.0363220762844822	1	*Cited1*
35	GO:0072506	BP	trivalent inorganic anion homeostasis	0.0363220762844822	1	*Sfrp4*
36	GO:0072087	BP	renal vesicle development	0.0363220762844822	1	*Cited1*
37	GO:1902430	BP	negative regulation of amyloid-beta formation	0.0363220762844822	1	*Spon1*
38	GO:0035584	BP	calcium-mediated signaling using intracellular calcium source	0.0363220762844822	1	*Ptgfr*
39	GO:0045606	BP	positive regulation of epidermal cell differentiation	0.0363220762844822	1	*Sfrp4*
40	GO:1902644	BP	tertiary alcohol metabolic process	0.0363220762844822	1	*Akr1c18*
41	GO:0034694	BP	response to prostaglandin	0.0363220762844822	1	*Ptgfr*

42	GO:0072273	BP	metanephric nephron morphogenesis	0.0363220762844822	1	*Cited1*
43	GO:0072202	BP	cell differentiation involved in metanephros development	0.0363220762844822	1	*Cited1*
44	GO:1902992	BP	negative regulation of amyloid precursor protein catabolic process	0.0363220762844822	1	*Spon1*
45	GO:0009190	BP	cyclic nucleotide biosynthetic process	0.0363220762844822	1	*Gucy1b1*
46	GO:0042438	BP	melanin biosynthetic process	0.0363220762844822	1	*Cited1*
47	GO:0052652	BP	cyclic purine nucleotide metabolic process	0.0363220762844822	1	*Gucy1b1*
48	GO:0045684	BP	positive regulation of epidermis development	0.0363220762844822	1	*Sfrp4*
49	GO:1902993	BP	positive regulation of amyloid precursor protein catabolic process	0.0363220762844822	1	*Spon1*
50	GO:0006582	BP	melanin metabolic process	0.0363220762844822	1	*Cited1*
51	GO:0006817	BP	phosphate ion transport	0.0363220762844822	1	*Sfrp4*
52	GO:0044550	BP	secondary metabolite biosynthetic process	0.0363220762844822	1	*Cited1*
53	GO:2000050	BP	regulation of non-canonical Wnt signaling pathway	0.0363220762844822	1	*Sfrp4*
54	GO:0003338	BP	metanephros morphogenesis	0.0369011073886157	1	*Cited1*
55	GO:0006706	BP	steroid catabolic process	0.0369011073886157	1	*Akr1c18*
56	GO:0010954	BP	positive regulation of protein processing	0.0379860909109293	1	*Spon1*
57	GO:0030318	BP	melanocyte differentiation	0.0379860909109293	1	*Cited1*
58	GO:0051923	BP	sulfation	0.0393731174192711	1	*Hs3st3b1*
59	GO:0070979	BP	protein K11-linked ubiquitination	0.0393731174192711	1	*Ube2u*
60	GO:1903319	BP	positive regulation of protein maturation	0.0393731174192711	1	*Spon1*
61	GO:0070670	BP	response to interleukin-4	0.0402333876494823	1	*Cited1*
62	GO:0009187	BP	cyclic nucleotide metabolic process	0.0402864027255204	1	*Gucy1b1*
63	GO:0070741	BP	response to interleukin-6	0.0402864027255204	1	*Cited1*
64	GO:1903792	BP	negative regulation of anion transport	0.0402864027255204	1	*Sfrp4*
65	GO:0002092	BP	positive regulation of receptor internalization	0.0411043138112918	1	*Sfrp4*

66	GO:1904037	BP	positive regulation of epithelial cell apoptotic process	0.0430957278680138	1	*Sfrp4*
67	GO:0019934	BP	cGMP-mediated signaling	0.043424818824246	1	*Gucy1b1*
68	GO:0046329	BP	negative regulation of JNK cascade	0.043424818824246	1	*Sfrp4*
69	GO:0072210	BP	metanephric nephron development	0.043424818824246	1	*Cited1*
70	GO:1901661	BP	quinone metabolic process	0.043424818824246	1	*Akr1c18*
71	GO:1902003	BP	regulation of amyloid-beta formation	0.043424818824246	1	*Spon1*
72	GO:0050931	BP	pigment cell differentiation	0.0437706979714841	1	*Cited1*
73	GO:0035850	BP	epithelial cell differentiation involved in kidney development	0.0455948871819941	1	*Cited1*
74	GO:0008207	BP	C21-steroid hormone metabolic process	0.0480608667152538	1	*Akr1c18*
75	GO:1902991	BP	regulation of amyloid precursor protein catabolic process	0.0487240626879358	1	*Spon1*
76	GO:0000578	BP	embryonic axis specification	0.049375624184649	1	*Cited1*
77	GO:0035410	MF	dihydrotestosterone 17-beta-dehydrogenase activity	4.23757396158004e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
78	GO:0047020	MF	15-hydroxyprostaglandin-D dehydrogenase (NADP+) activity	4.23757396158004e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
79	GO:0047086	MF	ketosteroid monooxygenase activity	4.23757396158004e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
80	GO:0047115	MF	trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase activity	4.23757396158004e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
81	GO:0047787	MF	delta4-3-oxosteroid 5beta-reductase activity	4.23757396158004e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
82	GO:0045550	MF	geranylgeranyl reductase activity	5.17693871550259e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
83	GO:0035671	MF	enone reductase activity	5.24299785652495e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
84	GO:0032052	MF	bile acid binding	5.48700638478284e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
85	GO:0047834	MF	D-threo-aldose 1-dehydrogenase activity	5.48700638478284e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
86	GO:0001758	MF	retinal dehydrogenase activity	6.53726004857438e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
87	GO:0047023	MF	androsterone dehydrogenase activity	6.53726004857438e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
88	GO:0004032	MF	alditol:NADP+ 1-oxidoreductase activity	8.21946227575465e-4	2	*Akr1c13, Akr1c18*
89	GO:0004745	MF	NAD-retinol dehydrogenase activity	0.00136355694703031	2	*Akr1c13, Akr1c18*

90	GO:0008106	MF	alcohol dehydrogenase (NADP+) activity	0.00164885101298622	2	*Akr1c13, Akr1c18*
91	GO:0016628	MF	oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	0.00164885101298622	2	*Akr1c13, Akr1c18*
92	GO:0004033	MF	aldo-keto reductase (NADP) activity	0.00184317967850148	2	*Akr1c13, Akr1c18*
93	GO:0016655	MF	oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, quinone or similar compound as acceptor	0.00214587258727855	2	*Akr1c13, Akr1c18*
94	GO:0033764	MF	steroid dehydrogenase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	0.00245577192536023	2	*Akr1c13, Akr1c18*
95	GO:0016229	MF	steroid dehydrogenase activity	0.00277163508626416	2	*Akr1c13, Akr1c18*
96	GO:0016620	MF	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	0.00354094560168153	2	*Akr1c13, Akr1c18*
97	GO:0016627	MF	oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	0.00428263529624581	2	*Akr1c13, Akr1c18*
98	GO:0016709	MF	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	0.00428263529624581	2	*Akr1c13, Akr1c18*
99	GO:0016903	MF	oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors	0.00428263529624581	2	*Akr1c13, Akr1c18*
100	GO:0016651	MF	oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H	0.00528887865861497	2	*Akr1c13, Akr1c18*
101	GO:0033293	MF	monocarboxylic acid binding	0.00706137201877357	2	*Akr1c13, Akr1c18*
102	GO:0004497	MF	monooxygenase activity	0.0159408882614046	2	*Akr1c13, Akr1c18*
103	GO:0016616	MF	oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	0.0159408882614046	2	*Akr1c13, Akr1c18*
104	GO:0016614	MF	oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	0.0168890423596606	2	*Akr1c13, Akr1c18*
105	GO:0031406	MF	carboxylic acid binding	0.0206062902688491	2	*Akr1c13, Akr1c18*
106	GO:0016705	MF	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	0.0295001586200273	2	*Akr1c13, Akr1c18*
107	GO:0004383	MF	guanylate cyclase activity	0.0312137524993497	1	*Gucy1b1*

108	GO:0004955	MF	prostaglandin receptor activity	0.0312137524993497	1	*Ptgfr*
109	GO:0070410	MF	co-SMAD binding	0.0312137524993497	1	*Cited1*
110	GO:0004016	MF	adenylate cyclase activity	0.0312137524993497	1	*Gucy1b1*
111	GO:0004954	MF	prostanoid receptor activity	0.0312137524993497	1	*Ptgfr*
112	GO:0034483	MF	heparan sulfate sulfotransferase activity	0.0353848869495768	1	*Hs3st3b1*
113	GO:0004953	MF	icosanoid receptor activity	0.0363220762844822	1	*Ptgfr*
114	GO:0009975	MF	cyclase activity	0.0363220762844822	1	*Gucy1b1*
115	GO:0016849	MF	phosphorus-oxygen lyase activity	0.0363220762844822	1	*Gucy1b1*
116	GO:0017147	MF	Wnt-protein binding	0.0379860909109293	1	*Sfrp4*
117	GO:0061631	MF	ubiquitin conjugating enzyme activity	0.0437706979714841	1	*Ube2u*
118	GO:0061650	MF	ubiquitin-like protein conjugating enzyme activity	0.0473857326225976	1	*Ube2u*

Tab. S6. Analiza funkcjonalna genów o zwiększonej ekspresji w komórkach ziarnistych myszy *db/db*.

Nr	Numer identyfikacyjny kategorii GO	Kategoria GO	Opis	Skorygowana wartość p	Liczba genów o zróżnicowanej ekspresji zaklasyfikowanych do danego procesu	Lista genów
1	GO:0048738	BP	cardiac muscle tissue development	0.00504840059860985	3	*Pdgfrb, Col11a1, Adamts9*
2	GO:0014706	BP	striated muscle tissue development	0.00504840059860985	3	*Pdgfrb, Col11a1, Adamts9*
3	GO:0061448	BP	connective tissue development	0.00504840059860985	3	*Nfib, Pdgfrb, Col11a1*
4	GO:0060537	BP	muscle tissue development	0.0115364985300676	3	*Pdgfrb, Col11a1, Adamts9*

5	GO:0035909	BP	aorta morphogenesis	0.00504840059860985	2	*Pdgfrb, Adamts9*
6	GO:0003229	BP	ventricular cardiac muscle tissue development	0.00979388983110615	2	*Col11a1, Adamts9*
7	GO:0035904	BP	aorta development	0.00979388983110615	2	*Pdgfrb, Adamts9*
8	GO:0048844	BP	artery morphogenesis	0.0112459010906051	2	*Pdgfrb, Adamts9*
9	GO:0002062	BP	chondrocyte differentiation	0.0161298332569326	2	*Nfib, Col11a1*
10	GO:0060840	BP	artery development	0.0161298332569326	2	*Pdgfrb, Adamts9*
11	GO:0051101	BP	regulation of DNA binding	0.0175635921760872	2	*Nfib, Zbtb7c*
12	GO:0060041	BP	retina development in camera-type eye	0.0300390098417984	2	*Pdgfrb, Nectin1*
13	GO:0051216	BP	cartilage development	0.0310748279426986	2	*Nfib, Col11a1*
14	GO:0030324	BP	lung development	0.0310748279426986	2	*Nfib, Pdgfrb*
15	GO:0030323	BP	respiratory tube development	0.0310748279426986	2	*Nfib, Pdgfrb*
16	GO:0007411	BP	axon guidance	0.0310748279426986	2	*Nfib, Nectin1*
17	GO:0097485	BP	neuron projection guidance	0.0310748279426986	2	*Nfib, Nectin1*
18	GO:0048705	BP	skeletal system morphogenesis	0.0310748279426986	2	*Pdgfrb, Col11a1*
19	GO:0060541	BP	respiratory system development	0.0310748279426986	2	*Nfib, Pdgfrb*
20	GO:0030198	BP	extracellular matrix organization	0.0310748279426986	2	*Col11a1, Adamts9*
21	GO:0043062	BP	extracellular structure organization	0.0310748279426986	2	*Col11a1, Adamts9*
22	GO:0045229	BP	external encapsulating structure organization	0.0310748279426986	2	*Col11a1, Adamts9*
23	GO:0090596	BP	sensory organ morphogenesis	0.0310748279426986	2	*Col11a1, Nectin1*
24	GO:0031589	BP	cell-substrate adhesion	0.0325840312788297	2	*Adamts9, Atrnl1*
25	GO:0043010	BP	camera-type eye development	0.0325840312788297	2	*Pdgfrb, Nectin1*
26	GO:0051098	BP	regulation of binding	0.0335756955259428	2	*Nfib, Zbtb7c*
27	GO:0001654	BP	eye development	0.033628749027467	2	*Pdgfrb, Nectin1*
28	GO:0150063	BP	visual system development	0.033628749027467	2	*Pdgfrb, Nectin1*
29	GO:0048880	BP	sensory system development	0.0336329777026515	2	*Pdgfrb, Nectin1*
30	GO:0048732	BP	gland development	0.0356807893830889	2	*Nfib, Pdgfrb*
31	GO:0007409	BP	axonogenesis	0.0359527365380037	2	*Nfib, Nectin1*

32	GO:0002934	BP	desmosome organization	0.0310748279426986	1	*Nectin1*
33	GO:0071670	BP	smooth muscle cell chemotaxis	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
34	GO:0072203	BP	cell proliferation involved in metanephros development	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
35	GO:0072102	BP	glomerulus morphogenesis	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
36	GO:0060502	BP	epithelial cell proliferation involved in lung morphogenesis	0.0310748279426986	1	*Nfib*
37	GO:1903025	BP	regulation of RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	0.0310748279426986	1	*Zbtb7c*
38	GO:0048070	BP	regulation of developmental pigmentation	0.0310748279426986	1	*Adamts9*
39	GO:0071679	BP	commissural neuron axon guidance	0.0310748279426986	1	*Nfib*
40	GO:0072110	BP	glomerular mesangial cell proliferation	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
41	GO:0120305	BP	regulation of pigmentation	0.0310748279426986	1	*Adamts9*
42	GO:2000489	BP	regulation of hepatic stellate cell activation	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
43	GO:0035791	BP	platelet-derived growth factor receptor-beta signaling pathway	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
44	GO:0061140	BP	lung secretory cell differentiation	0.0310748279426986	1	*Nfib*
45	GO:0072224	BP	metanephric glomerulus development	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
46	GO:1903671	BP	negative regulation of sprouting angiogenesis	0.0310748279426986	1	*Adamts9*
47	GO:0035733	BP	hepatic stellate cell activation	0.0325840312788297	1	*Pdgfrb*
48	GO:0072109	BP	glomerular mesangium development	0.0327209804510647	1	*Pdgfrb*
49	GO:0060947	BP	cardiac vascular smooth muscle cell differentiation	0.0335756955259428	1	*Pdgfrb*
50	GO:0044406	BP	adhesion of symbiont to host	0.0335756955259428	1	*Nectin1*
51	GO:0055003	BP	cardiac myofibril assembly	0.0335756955259428	1	*Pdgfrb*
52	GO:0072537	BP	fibroblast activation	0.0335756955259428	1	*Pdgfrb*
53	GO:0060973	BP	cell migration involved in heart development	0.033628749027467	1	*Pdgfrb*
54	GO:0001502	BP	cartilage condensation	0.033676528942479	1	*Col11a1*
55	GO:0070166	BP	enamel mineralization	0.033676528942479	1	*Nectin1*

56	GO:0032516	BP	positive regulation of phosphoprotein phosphatase activity	0.0337197333181861	1	*Pdgfrb*
57	GO:0050910	BP	detection of mechanical stimulus involved in sensory perception of sound	0.0337197333181861	1	*Col11a1*
58	GO:0072111	BP	cell proliferation involved in kidney development	0.0337197333181861	1	*Pdgfrb*
59	GO:1902894	BP	negative regulation of miRNA transcription	0.0347374622863709	1	*Nfib*
60	GO:0030325	BP	adrenal gland development	0.0356807893830889	1	*Pdgfrb*
61	GO:0048857	BP	neural nucleus development	0.0356807893830889	1	*Nfib*
62	GO:0098743	BP	cell aggregation	0.0356807893830889	1	*Col11a1*
63	GO:0072012	BP	glomerulus vasculature development	0.0359527365380037	1	*Pdgfrb*
64	GO:0002089	BP	lens morphogenesis in camera-type eye	0.0359527365380037	1	*Nectin1*
65	GO:0061298	BP	retina vasculature development in camera-type eye	0.0359527365380037	1	*Pdgfrb*
66	GO:0061437	BP	renal system vasculature development	0.0359527365380037	1	*Pdgfrb*
67	GO:0061440	BP	kidney vasculature development	0.0359527365380037	1	*Pdgfrb*
68	GO:0097186	BP	amelogenesis	0.0359527365380037	1	*Nectin1*
69	GO:0030318	BP	melanocyte differentiation	0.0359527365380037	1	*Adamts9*
70	GO:0090280	BP	positive regulation of calcium ion import	0.0359527365380037	1	*Pdgfrb*
71	GO:0048745	BP	smooth muscle tissue development	0.0366766984662141	1	*Pdgfrb*
72	GO:0021952	BP	central nervous system projection neuron axonogenesis	0.0366766984662141	1	*Nfib*
73	GO:0032967	BP	positive regulation of collagen biosynthetic process	0.0366766984662141	1	*Pdgfrb*
74	GO:0043552	BP	positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity	0.0366766984662141	1	*Pdgfrb*
75	GO:0060977	BP	coronary vasculature morphogenesis	0.037430029759642	1	*Pdgfrb*
76	GO:0002063	BP	chondrocyte development	0.0375494412481608	1	*Col11a1*
77	GO:0034505	BP	tooth mineralization	0.0375494412481608	1	*Nectin1*
78	GO:0010714	BP	positive regulation of collagen metabolic process	0.0375494412481608	1	*Pdgfrb*

79	GO:0010863	BP	positive regulation of phospholipase C activity	0.0375494412481608	1	*Pdgfrb*
80	GO:0060487	BP	lung epithelial cell differentiation	0.0375494412481608	1	*Nfib*
81	GO:0035025	BP	positive regulation of Rho protein signal transduction	0.0375494412481608	1	*Pdgfrb*
82	GO:0060479	BP	lung cell differentiation	0.0375494412481608	1	*Nfib*
83	GO:0090218	BP	positive regulation of lipid kinase activity	0.0375494412481608	1	*Pdgfrb*
84	GO:0010922	BP	positive regulation of phosphatase activity	0.0382236877775588	1	*Pdgfrb*
85	GO:0007435	BP	salivary gland morphogenesis	0.0387558770532836	1	*Nfib*
86	GO:0072210	BP	metanephric nephron development	0.0387558770532836	1	*Pdgfrb*
87	GO:1900274	BP	regulation of phospholipase C activity	0.0387558770532836	1	*Pdgfrb*
88	GO:0050931	BP	pigment cell differentiation	0.0393849701492733	1	*Adamts9*
89	GO:1903670	BP	regulation of sprouting angiogenesis	0.0394785533007733	1	*Adamts9*
90	GO:0007431	BP	salivary gland development	0.0394785533007733	1	*Nfib*
91	GO:0035886	BP	vascular associated smooth muscle cell differentiation	0.0394785533007733	1	*Pdgfrb*
92	GO:0043551	BP	regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity	0.0394785533007733	1	*Pdgfrb*
93	GO:0038084	BP	vascular endothelial growth factor signaling pathway	0.040065716802586	1	*Pdgfrb*
94	GO:0010464	BP	regulation of mesenchymal cell proliferation	0.0404783081852716	1	*Nfib*
95	GO:0021955	BP	central nervous system neuron axonogenesis	0.0404783081852716	1	*Nfib*
96	GO:0045840	BP	positive regulation of mitotic nuclear division	0.0406735230714484	1	*Pdgfrb*
97	GO:0097178	BP	ruffle assembly	0.0406735230714484	1	*Pdgfrb*
98	GO:0006024	BP	glycosaminoglycan biosynthetic process	0.0413914813342623	1	*Pdgfrb*
99	GO:0035307	BP	positive regulation of protein dephosphorylation	0.0413914813342623	1	*Pdgfrb*
100	GO:0050974	BP	detection of mechanical stimulus involved in sensory perception	0.0413914813342623	1	*Col11a1*
101	GO:0003179	BP	heart valve morphogenesis	0.0415627343600716	1	*Adamts9*
102	GO:0032965	BP	regulation of collagen biosynthetic process	0.0415627343600716	1	*Pdgfrb*

103	GO:0007157	BP	heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	0.0426132880334524	1	*Nectin1*
104	GO:0010518	BP	positive regulation of phospholipase activity	0.0426132880334524	1	*Pdgfrb*
105	GO:0048066	BP	developmental pigmentation	0.0426132880334524	1	*Adamts9*
106	GO:0060428	BP	lung epithelium development	0.0426132880334524	1	*Nfib*
107	GO:0090279	BP	regulation of calcium ion import	0.0426132880334524	1	*Pdgfrb*
108	GO:0043392	BP	negative regulation of DNA binding	0.0426132880334524	1	*Nfib*
109	GO:0043550	BP	regulation of lipid kinase activity	0.0426132880334524	1	*Pdgfrb*
110	GO:2000677	BP	regulation of transcription regulatory region DNA binding	0.0426132880334524	1	*Zbtb7c*
111	GO:0006023	BP	aminoglycan biosynthetic process	0.0426132880334524	1	*Pdgfrb*
112	GO:0035272	BP	exocrine system development	0.0426132880334524	1	*Nfib*
113	GO:0010596	BP	negative regulation of endothelial cell migration	0.0426132880334524	1	*Adamts9*
114	GO:0010712	BP	regulation of collagen metabolic process	0.0426132880334524	1	*Pdgfrb*
115	GO:0055010	BP	ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis	0.0426132880334524	1	*Col11a1*
116	GO:0010463	BP	mesenchymal cell proliferation	0.0431168336528807	1	*Nfib*
117	GO:0031529	BP	ruffle organization	0.0431168336528807	1	*Pdgfrb*
118	GO:0032964	BP	collagen biosynthetic process	0.0431168336528807	1	*Pdgfrb*
119	GO:0043666	BP	regulation of phosphoprotein phosphatase activity	0.0431168336528807	1	*Pdgfrb*
120	GO:0003170	BP	heart valve development	0.0431168336528807	1	*Adamts9*
121	GO:0006826	BP	iron ion transport	0.0431168336528807	1	*Nectin1*
122	GO:0030199	BP	collagen fibril organization	0.0431168336528807	1	*Col11a1*
123	GO:0035924	BP	cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	0.043535889062876	1	*Pdgfrb*
124	GO:0050982	BP	detection of mechanical stimulus	0.0441527826646373	1	*Col11a1*
125	GO:0010517	BP	regulation of phospholipase activity	0.0441527826646373	1	*Pdgfrb*
126	GO:0035306	BP	positive regulation of dephosphorylation	0.0441527826646373	1	*Pdgfrb*
127	GO:0051785	BP	positive regulation of nuclear division	0.0441527826646373	1	*Pdgfrb*

128	GO:0014911	BP	positive regulation of smooth muscle cell migration	0.0442503770599466	1	*Pdgfrb*
129	GO:0060193	BP	positive regulation of lipase activity	0.0442503770599466	1	*Pdgfrb*
130	GO:0032835	BP	glomerulus development	0.0443452436690453	1	*Pdgfrb*
131	GO:0048008	BP	platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	0.0443452436690453	1	*Pdgfrb*
132	GO:0045600	BP	positive regulation of fat cell differentiation	0.0464410168257349	1	*Zbtb7c*
133	GO:0060425	BP	lung morphogenesis	0.0464410168257349	1	*Nfib*
134	GO:0030239	BP	myofibril assembly	0.0466265119615064	1	*Pdgfrb*
135	GO:0048146	BP	positive regulation of fibroblast proliferation	0.0466265119615064	1	*Pdgfrb*
136	GO:0010633	BP	negative regulation of epithelial cell migration	0.0466265119615064	1	*Adamts9*
137	GO:0046579	BP	positive regulation of Ras protein signal transduction	0.0466265119615064	1	*Pdgfrb*
138	GO:0055002	BP	striated muscle cell development	0.0466265119615064	1	*Pdgfrb*
139	GO:0055008	BP	cardiac muscle tissue morphogenesis	0.0466265119615064	1	*Col11a1*
140	GO:0014068	BP	positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	0.0479527739224193	1	*Pdgfrb*
141	GO:0006029	BP	proteoglycan metabolic process	0.0483250507942868	1	*Col11a1*
142	GO:0060976	BP	coronary vasculature development	0.0483250507942868	1	*Pdgfrb*
143	GO:2000379	BP	positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	0.0486520428186565	1	*Pdgfrb*
144	GO:0051057	BP	positive regulation of small GTPase mediated signal transduction	0.0487139884355936	1	*Pdgfrb*
145	GO:0051145	BP	smooth muscle cell differentiation	0.0487139884355936	1	*Pdgfrb*
146	GO:2000573	BP	positive regulation of DNA biosynthetic process	0.0487139884355936	1	*Pdgfrb*
147	GO:0003208	BP	cardiac ventricle morphogenesis	0.0487436700182039	1	*Col11a1*
148	GO:0062023	CC	collagen-containing extracellular matrix	0.0335756955259428	2	*Col11a1, Atrnl1*
149	GO:0005583	CC	fibrillar collagen trimer	0.0310748279426986	1	*Col11a1*
150	GO:0098643	CC	banded collagen fibril	0.0310748279426986	1	*Col11a1*

151	GO:0098945	CC	intrinsic component of presynaptic active zone membrane	0.0310748279426986	1	*Nectin1*
152	GO:0098644	CC	complex of collagen trimers	0.0335756955259428	1	*Col11a1*
153	GO:0048787	CC	presynaptic active zone membrane	0.0359527365380037	1	*Nectin1*
154	GO:0098686	CC	hippocampal mossy fiber to CA3 synapse	0.0359527365380037	1	*Nectin1*
155	GO:0099056	CC	integral component of presynaptic membrane	0.0404783081852716	1	*Nectin1*
156	GO:0098889	CC	intrinsic component of presynaptic membrane	0.0426132880334524	1	*Nectin1*
157	GO:0048786	CC	presynaptic active zone	0.0476128638936351	1	*Nectin1*
158	GO:0005581	CC	collagen trimer	0.0487436700182039	1	*Col11a1*
159	GO:0008201	MF	heparin binding	0.0287392106306939	2	*Col11a1, Pcolce*
160	GO:0005539	MF	glycosaminoglycan binding	0.0310748279426986	2	*Col11a1, Pcolce*
161	GO:0030246	MF	carbohydrate binding	0.0310748279426986	2	*Nectin1, Atrnl1*
162	GO:1901681	MF	sulfur compound binding	0.0310748279426986	2	*Col11a1, Pcolce*
163	GO:0048407	MF	platelet-derived growth factor binding	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
164	GO:0005161	MF	platelet-derived growth factor receptor binding	0.0310748279426986	1	*Pdgfrb*
165	GO:0140416	MF	transcription regulator inhibitor activity	0.0335756955259428	1	*Nfib*
166	GO:0030020	MF	extracellular matrix structural constituent conferring tensile strength	0.0387558770532836	1	*Col11a1*
167	GO:0043548	MF	phosphatidylinositol 3-kinase binding	0.0394785533007733	1	*Pdgfrb*
168	GO:0016504	MF	peptidase activator activity	0.0404783081852716	1	*Pcolce*
169	GO:0004714	MF	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	0.0431168336528807	1	*Pdgfrb*
170	GO:0140678	MF	molecular function inhibitor activity	0.043948955748353	1	*Nfib*
171	GO:0019199	MF	transmembrane receptor protein kinase activity	0.0482883648580613	1	*Pdgfrb*
172	GO:0005518	MF	collagen binding	0.0487139884355936	1	*Pcolce*

Tab. S7. Analiza funkcjonalna genów o obniżonej ekspresji w komórkach ziarnistych myszy *ob/ob*.

Nr	Numer identyfikacyjny kategorii GO	Kategoria GO	Opis	Skorygowana wartość p	Liczba genów o zróżnicowanej ekspresji zaklasyfikowanych do danego procesu	Lista genów
1	GO:0072006	BP	nephron development	2.33668101946561e-5	6	*Klhl3, Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
2	GO:0001822	BP	kidney development	2.84007837821596e-4	6	*Klhl3, Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
3	GO:0072001	BP	renal system development	3.32857114186746e-4	6	*Klhl3, Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
4	GO:0001655	BP	urogenital system development	5.28613007621632e-4	6	*Klhl3, Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
5	GO:0060562	BP	epithelial tube morphogenesis	5.28613007621632e-4	6	*Klhl3, Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
6	GO:2001233	BP	regulation of apoptotic signaling pathway	5.28613007621632e-4	6	*Pmp22, Unc5b, Lmna, Dapk2, Wnt4, Agtr2*
7	GO:0042692	BP	muscle cell differentiation	6.80562113705951e-4	6	*Pmp22, Lmna, Pdgfra, Tpm1, Wnt4, Agtr2*
8	GO:0072078	BP	nephron tubule morphogenesis	2.33668101946561e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
9	GO:0072088	BP	nephron epithelium morphogenesis	2.33668101946561e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
10	GO:0072028	BP	nephron morphogenesis	2.33668101946561e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*

11	GO:0061333	BP	renal tubule morphogenesis	2.33668101946561e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
12	GO:0072080	BP	nephron tubule development	3.47894551065365e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
13	GO:0060993	BP	kidney morphogenesis	3.47894551065365e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
14	GO:0061326	BP	renal tubule development	3.85987500655749e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
15	GO:0072009	BP	nephron epithelium development	5.11829665898621e-5	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
16	GO:0072073	BP	kidney epithelium development	1.68900010416876e-4	5	*Klhl3, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
17	GO:0048754	BP	branching morphogenesis of an epithelial tube	3.32857114186746e-4	5	*Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
18	GO:0055001	BP	muscle cell development	5.28613007621632e-4	5	*Pmp22, Lmna, Pdgfra, Tpm1, Agtr2*
19	GO:0061138	BP	morphogenesis of a branching epithelium	5.28613007621632e-4	5	*Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
20	GO:0001763	BP	morphogenesis of a branching structure	6.73213174228403e-4	5	*Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
21	GO:0051146	BP	striated muscle cell differentiation	0.00201843526183863	5	*Pmp22, Lmna, Pdgfra, Tpm1, Agtr2*
22	GO:0008202	BP	steroid metabolic process	0.00214415893468787	5	*Pmp22, Akr1c18, Pdgfra, Apoa1, Wnt4*
23	GO:0006066	BP	alcohol metabolic process	0.0023024731669096	5	*Pmp22, Akr1c18, Snca, Apoa1, Wnt4*
24	GO:0019216	BP	regulation of lipid metabolic process	0.00317670399752016	5	*Akr1c18, Snca, Pdgfra, Apoa1, Wnt4*
25	GO:0032102	BP	negative regulation of response to external stimulus	0.0036975728386617	5	*Pdgfra, Apoa1, Wnt4, Susd4, Abat*
26	GO:0045785	BP	positive regulation of cell adhesion	0.00596528175792244	5	*Podxl, Apoa1, Tpm1, Wnt4, Col16a1*
27	GO:0060537	BP	muscle tissue development	0.00633328183856884	5	*Pmp22, Lmna, Pdgfra, Tpm1, Agtr2*
28	GO:0001658	BP	branching involved in ureteric bud morphogenesis	1.91858946524759e-4	4	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*

29	GO:0060675	BP	ureteric bud morphogenesis	2.55725807994358e-4	4	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
30	GO:0072171	BP	mesonephric tubule morphogenesis	2.55725807994358e-4	4	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
31	GO:0001656	BP	metanephros development	4.24318092447458e-4	4	*Pdgfra, Wnt4, Hoxd11, Agtr2*
32	GO:0001657	BP	ureteric bud development	5.28613007621632e-4	4	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
33	GO:0072163	BP	mesonephric epithelium development	5.28613007621632e-4	4	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
34	GO:0072164	BP	mesonephric tubule development	5.28613007621632e-4	4	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
35	GO:0001823	BP	mesonephros development	5.68037830895249e-4	4	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2, Hs3st3b1*
36	GO:0031032	BP	actomyosin structure organization	0.00390936408300391	4	*Pdgfra, Apoa1, Tpm1, Wnt4*
37	GO:1901617	BP	organic hydroxy compound biosynthetic process	0.0048130274067352	4	*Snca, Apoa1, Wnt4, Agtr2*
38	GO:0042180	BP	cellular ketone metabolic process	0.00486121642143567	4	*Akr1c18, Snca, Apoa1, Wnt4*
39	GO:0015850	BP	organic hydroxy compound transport	0.00579703997684516	4	*Snca, Apoa1, Abat, Agtr2*
40	GO:0048738	BP	cardiac muscle tissue development	0.00633328183856884	4	*Lmna, Pdgfra, Tpm1, Agtr2*
41	GO:0014706	BP	striated muscle tissue development	0.00709864066297289	4	*Lmna, Pdgfra, Tpm1, Agtr2*
42	GO:0007162	BP	negative regulation of cell adhesion	0.00817848606104372	4	*Podxl, Plxna2, Apoa1, Abat*
43	GO:0030198	BP	extracellular matrix organization	0.00817848606104372	4	*Pmp22, Pdgfra, Col4a2, Col16a1*
44	GO:0043062	BP	extracellular structure organization	0.00817848606104372	4	*Pmp22, Pdgfra, Col4a2, Col16a1*
45	GO:0045229	BP	external encapsulating structure organization	0.00817848606104372	4	*Pmp22, Pdgfra, Col4a2, Col16a1*
46	GO:0006790	BP	sulfur compound metabolic process	0.00889230460337466	4	*Snca, Bgn, Mical2, Hs3st3b1*

47	GO:0022604	BP	regulation of cell morphogenesis	0.00962357670820752	4	*Sparc, Plxna2, Apoa1, Tpm1*
48	GO:0042060	BP	wound healing	0.0129629193636814	4	*Pdgfra, Tpm1, Wnt4, Abat*
49	GO:0003002	BP	regionalization	0.01390419853647	4	*Hoxc10, Plxna2, Mns1, Hoxd11*
50	GO:1902903	BP	regulation of supramolecular fiber organization	0.0139556992125675	4	*Snca, Apoa1, Tpm1, Wnt4*
51	GO:0003012	BP	muscle system process	0.0172568337869221	4	*Lmna, Tpm1, Abat, Agtr2*
52	GO:0034329	BP	cell junction assembly	0.0184503634115796	4	*Pmp22, Snca, Wnt4, Col16a1*
53	GO:0006631	BP	fatty acid metabolic process	0.0184641922558862	4	*Akr1c18, Elovl2, Snca, Apoa1*
54	GO:0007015	BP	actin filament organization	0.0197780884248244	4	*Apoa1, Tpm1, Wnt4, Mical2*
55	GO:0022407	BP	regulation of cell-cell adhesion	0.0210438204805722	4	*Podxl, Apoa1, Wnt4, Abat*
56	GO:0007389	BP	pattern specification process	0.0235715714686242	4	*Hoxc10, Plxna2, Mns1, Hoxd11*
57	GO:0050808	BP	synapse organization	0.0237846119862786	4	*Pmp22, Sparc, Snca, Palld*
58	GO:0051953	BP	negative regulation of amine transport	6.80562113705951e-4	3	*Snca, Abat, Agtr2*
59	GO:0072210	BP	metanephric nephron development	7.1448495042003e-4	3	*Pdgfra, Wnt4, Agtr2*
60	GO:1905332	BP	positive regulation of morphogenesis of an epithelium	8.0932994713414e-4	3	*Pdgfra, Wnt4, Agtr2*
61	GO:0042417	BP	dopamine metabolic process	0.00119999107373315	3	*Snca, Abat, Agtr2*
62	GO:0051353	BP	positive regulation of oxidoreductase activity	0.00210157905080711	3	*Snca, Pdp1, Agtr2*
63	GO:0051496	BP	positive regulation of stress fiber assembly	0.00214415893468787	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
64	GO:0006584	BP	catecholamine metabolic process	0.00237554717318606	3	*Snca, Abat, Agtr2*
65	GO:0009712	BP	catechol-containing compound metabolic process	0.00237554717318606	3	*Snca, Abat, Agtr2*
66	GO:0032233	BP	positive regulation of actin filament bundle assembly	0.00298701054346521	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*

67	GO:0050433	BP	regulation of catecholamine secretion	0.00298701054346521	3	*Snca, Abat, Agtr2*
68	GO:0050432	BP	catecholamine secretion	0.00317670399752016	3	*Snca, Abat, Agtr2*
69	GO:0061045	BP	negative regulation of wound healing	0.00330752127416161	3	*Pdgfra, Wnt4, Abat*
70	GO:1905330	BP	regulation of morphogenesis of an epithelium	0.00330752127416161	3	*Pdgfra, Wnt4, Agtr2*
71	GO:0045669	BP	positive regulation of osteoblast differentiation	0.00351197210262429	3	*Lmna, Wnt4, Scube3*
72	GO:0060191	BP	regulation of lipase activity	0.00446441206058075	3	*Snca, Pdgfra, Apoa1*
73	GO:0032890	BP	regulation of organic acid transport	0.0047715764673915	3	*Snca, Abat, Agtr2*
74	GO:0051937	BP	catecholamine transport	0.0047715764673915	3	*Snca, Abat, Agtr2*
75	GO:1903035	BP	negative regulation of response to wounding	0.00501099012910947	3	*Pdgfra, Wnt4, Abat*
76	GO:0051341	BP	regulation of oxidoreductase activity	0.00542374236172333	3	*Snca, Pdp1, Agtr2*
77	GO:0051492	BP	regulation of stress fiber assembly	0.00579703997684516	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
78	GO:0055013	BP	cardiac muscle cell development	0.0062108319915846	3	*Lmna, Pdgfra, Agtr2*
79	GO:0015844	BP	monoamine transport	0.00633328183856884	3	*Snca, Abat, Agtr2*
80	GO:0006576	BP	cellular biogenic amine metabolic process	0.00633328183856884	3	*Snca, Abat, Agtr2*
81	GO:0055006	BP	cardiac cell development	0.00660184209046205	3	*Lmna, Pdgfra, Agtr2*
82	GO:0110020	BP	regulation of actomyosin structure organization	0.00668406747182205	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
83	GO:2000181	BP	negative regulation of blood vessel morphogenesis	0.00671217795284669	3	*Sparc, Col4a2, Wnt4*
84	GO:1901343	BP	negative regulation of vasculature development	0.00680864232334473	3	*Sparc, Col4a2, Wnt4*
85	GO:0032231	BP	regulation of actin filament bundle assembly	0.00694434119611316	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
86	GO:0030038	BP	contractile actin filament bundle assembly	0.00694434119611316	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
87	GO:0043149	BP	stress fiber assembly	0.00694434119611316	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
88	GO:0051952	BP	regulation of amine transport	0.00694434119611316	3	*Snca, Abat, Agtr2*
89	GO:0019218	BP	regulation of steroid metabolic process	0.00696654943034632	3	*Akr1c18, Apoa1, Wnt4*
90	GO:0044070	BP	regulation of anion transport	0.00696654943034632	3	*Snca, Abat, Agtr2*
91	GO:0015837	BP	amine transport	0.00724511618869767	3	*Snca, Abat, Agtr2*

92	GO:0044106	BP	cellular amine metabolic process	0.00724511618869767	3	*Snca, Abat, Agtr2*
93	GO:0034754	BP	cellular hormone metabolic process	0.00724511618869767	3	*Akr1c18, Pdgfra, Wnt4*
94	GO:0010927	BP	cellular component assembly involved in morphogenesis	0.00734681131306791	3	*Pmp22, Pdgfra, Tpm1*
95	GO:0009308	BP	amine metabolic process	0.00773015400263163	3	*Snca, Abat, Agtr2*
96	GO:0018958	BP	phenol-containing compound metabolic process	0.00773015400263163	3	*Snca, Abat, Agtr2*
97	GO:0061041	BP	regulation of wound healing	0.00817848606104372	3	*Pdgfra, Wnt4, Abat*
98	GO:2000027	BP	regulation of animal organ morphogenesis	0.00817848606104372	3	*Wnt4, Hoxd11, Agtr2*
99	GO:0010811	BP	positive regulation of cell-substrate adhesion	0.00902152273019207	3	*Apoa1, Wnt4, Col16a1*
100	GO:0035270	BP	endocrine system development	0.00902152273019207	3	*Pdgfra, Apoa1, Wnt4*
101	GO:0046165	BP	alcohol biosynthetic process	0.00913412544433908	3	*Snca, Apoa1, Wnt4*
102	GO:0055007	BP	cardiac muscle cell differentiation	0.0103790078923451	3	*Lmna, Pdgfra, Agtr2*
103	GO:0010565	BP	regulation of cellular ketone metabolic process	0.0111185274907943	3	*Snca, Apoa1, Wnt4*
104	GO:0045667	BP	regulation of osteoblast differentiation	0.0120125192752048	3	*Lmna, Wnt4, Scube3*
105	GO:0062013	BP	positive regulation of small molecule metabolic process	0.013699549790365	3	*Snca, Apoa1, Wnt4*
106	GO:0006694	BP	steroid biosynthetic process	0.0138327156830736	3	*Akr1c18, Apoa1, Wnt4*
107	GO:2001236	BP	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	0.01390419853647	3	*Unc5b, Lmna, Agtr2*
108	GO:0051017	BP	actin filament bundle assembly	0.0139556992125675	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
109	GO:1903531	BP	negative regulation of secretion by cell	0.0139556992125675	3	*Snca, Abat, Agtr2*
110	GO:0035107	BP	appendage morphogenesis	0.0139556992125675	3	*Hoxc10, Plxna2, Hoxd11*
111	GO:0035108	BP	limb morphogenesis	0.0139556992125675	3	*Hoxc10, Plxna2, Hoxd11*
112	GO:1903034	BP	regulation of response to wounding	0.0139556992125675	3	*Pdgfra, Wnt4, Abat*
113	GO:0061572	BP	actin filament bundle organization	0.0141413885594665	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
114	GO:0043271	BP	negative regulation of ion transport	0.0141413885594665	3	*Snca, Abat, Agtr2*

115	GO:1902905	BP	positive regulation of supramolecular fiber organization	0.0151467803936729	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
116	GO:0035051	BP	cardiocyte differentiation	0.0154274910286636	3	*Lmna, Pdgfra, Agtr2*
117	GO:0045834	BP	positive regulation of lipid metabolic process	0.0154274910286636	3	*Pdgfra, Apoa1, Wnt4*
118	GO:0044703	BP	multi-organism reproductive process	0.0159296771111948	3	*Pmp22, Akr1c18, Wnt4*
119	GO:0030534	BP	adult behavior	0.0159954514358684	3	*Pmp22, Snca, Abat*
120	GO:0051048	BP	negative regulation of secretion	0.0184314110915359	3	*Snca, Abat, Agtr2*
121	GO:0046890	BP	regulation of lipid biosynthetic process	0.0184568424652629	3	*Akr1c18, Apoa1, Wnt4*
122	GO:0048736	BP	appendage development	0.0184568424652629	3	*Hoxc10, Plxna2, Hoxd11*
123	GO:0060173	BP	limb development	0.0184568424652629	3	*Hoxc10, Plxna2, Hoxd11*
124	GO:0051495	BP	positive regulation of cytoskeleton organization	0.0184568424652629	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
125	GO:0120032	BP	regulation of plasma membrane bounded cell projection assembly	0.0184568424652629	3	*Podxl, Mns1, Septin9*
126	GO:0022408	BP	negative regulation of cell-cell adhesion	0.0188093643279148	3	*Podxl, Apoa1, Abat*
127	GO:0060491	BP	regulation of cell projection assembly	0.0188093643279148	3	*Podxl, Mns1, Septin9*
128	GO:0008217	BP	regulation of blood pressure	0.0212349489161426	3	*Tpm1, Abat, Agtr2*
129	GO:1901888	BP	regulation of cell junction assembly	0.0212349489161426	3	*Snca, Wnt4, Col16a1*
130	GO:0001649	BP	osteoblast differentiation	0.0215565760244463	3	*Lmna, Wnt4, Scube3*
131	GO:0042445	BP	hormone metabolic process	0.0215565760244463	3	*Akr1c18, Pdgfra, Wnt4*
132	GO:0010810	BP	regulation of cell-substrate adhesion	0.0224850387533955	3	*Apoa1, Wnt4, Col16a1*
133	GO:0009952	BP	anterior/posterior pattern specification	0.0238403675129483	3	*Hoxc10, Plxna2, Hoxd11*
134	GO:0097191	BP	extrinsic apoptotic signaling pathway	0.0249975525389061	3	*Unc5b, Lmna, Agtr2*
135	GO:2001234	BP	negative regulation of apoptotic signaling pathway	0.0258068474591399	3	*Unc5b, Lmna, Wnt4*
136	GO:0006470	BP	protein dephosphorylation	0.0263279852712992	3	*Ptprb, Pdp1, Agtr2*
137	GO:0060348	BP	bone development	0.0285556059730902	3	*Sparc, Bgn, Hoxd11*

138	GO:0007626	BP	locomotory behavior	0.0305003906457381	3	*Pmp22, Snca, Abat*
139	GO:0110053	BP	regulation of actin filament organization	0.0332648015146612	3	*Apoa1, Tpm1, Wnt4*
140	GO:0046942	BP	carboxylic acid transport	0.0366777540898557	3	*Snca, Abat, Agtr2*
141	GO:0046394	BP	carboxylic acid biosynthetic process	0.0381201747243221	3	*Elovl2, Apoa1, Abat*
142	GO:0061448	BP	connective tissue development	0.0381201747243221	3	*Lmna, Bgn, Hoxd11*
143	GO:0016053	BP	organic acid biosynthetic process	0.0381201747243221	3	*Elovl2, Apoa1, Abat*
144	GO:0090287	BP	regulation of cellular response to growth factor stimulus	0.0393332190649692	3	*Wnt4, Scube3, Agtr2*
145	GO:1901342	BP	regulation of vasculature development	0.042396906784976	3	*Sparc, Col4a2, Wnt4*
146	GO:0031647	BP	regulation of protein stability	0.0429797910293905	3	*Snca, Lmna, Apoa1*
147	GO:0015849	BP	organic acid transport	0.0455253679323608	3	*Snca, Abat, Agtr2*
148	GO:0090184	BP	positive regulation of kidney development	0.00302652145479561	2	*Wnt4, Agtr2*
149	GO:0032060	BP	bleb assembly	0.0036975728386617	2	*Pmp22, Emp3*
150	GO:0072224	BP	metanephric glomerulus development	0.00414798474251526	2	*Pdgfra, Agtr2*
151	GO:0042416	BP	dopamine biosynthetic process	0.0048130274067352	2	*Snca, Agtr2*
152	GO:0010544	BP	negative regulation of platelet activation	0.00579703997684516	2	*Pdgfra, Abat*
153	GO:0033604	BP	negative regulation of catecholamine secretion	0.00579703997684516	2	*Abat, Agtr2*
154	GO:0048148	BP	behavioral response to cocaine	0.00633328183856884	2	*Snca, Abat*
155	GO:1902644	BP	tertiary alcohol metabolic process	0.00633328183856884	2	*Akr1c18, Wnt4*
156	GO:0010039	BP	response to iron ion	0.00668406747182205	2	*Snca, Abat*
157	GO:0042053	BP	regulation of dopamine metabolic process	0.00694434119611316	2	*Snca, Abat*
158	GO:0008211	BP	glucocorticoid metabolic process	0.00724511618869767	2	*Apoa1, Wnt4*
159	GO:0030325	BP	adrenal gland development	0.00724511618869767	2	*Pdgfra, Apoa1*
160	GO:0042069	BP	regulation of catecholamine metabolic process	0.00724511618869767	2	*Snca, Abat*
161	GO:0003338	BP	metanephros morphogenesis	0.00792329751237605	2	*Wnt4, Agtr2*
162	GO:0009713	BP	catechol-containing compound biosynthetic process	0.00792329751237605	2	*Snca, Agtr2*
163	GO:0042423	BP	catecholamine biosynthetic process	0.00792329751237605	2	*Snca, Agtr2*

164	GO:0015874	BP	norepinephrine transport	0.00817848606104372	2	*Snca, Agtr2*
165	GO:0051894	BP	positive regulation of focal adhesion assembly	0.00817848606104372	2	*Wnt4, Col16a1*
166	GO:0032891	BP	negative regulation of organic acid transport	0.00836242082483373	2	*Abat, Agtr2*
167	GO:1902932	BP	positive regulation of alcohol biosynthetic process	0.00836242082483373	2	*Snca, Wnt4*
168	GO:0045724	BP	positive regulation of cilium assembly	0.0088766078385038	2	*Mns1, Septin9*
169	GO:0150117	BP	positive regulation of cell-substrate junction organization	0.0101436673292167	2	*Wnt4, Col16a1*
170	GO:1903792	BP	negative regulation of anion transport	0.0101436673292167	2	*Abat, Agtr2*
171	GO:0090183	BP	regulation of kidney development	0.0111443701615095	2	*Wnt4, Agtr2*
172	GO:0009954	BP	proximal/distal pattern formation	0.0121683802318828	2	*Hoxc10, Hoxd11*
173	GO:0035640	BP	exploration behavior	0.0121683802318828	2	*Abat, Agtr2*
174	GO:0033238	BP	regulation of cellular amine metabolic process	0.0132138131203386	2	*Snca, Abat*
175	GO:0014046	BP	dopamine secretion	0.0139556992125675	2	*Snca, Abat*
176	GO:0014059	BP	regulation of dopamine secretion	0.0139556992125675	2	*Snca, Abat*
177	GO:0110110	BP	positive regulation of animal organ morphogenesis	0.0139556992125675	2	*Wnt4, Hoxd11*
178	GO:0009309	BP	amine biosynthetic process	0.0141413885594665	2	*Snca, Agtr2*
179	GO:0042220	BP	response to cocaine	0.0141413885594665	2	*Snca, Abat*
180	GO:0042401	BP	cellular biogenic amine biosynthetic process	0.0141413885594665	2	*Snca, Agtr2*
181	GO:0008207	BP	C21-steroid hormone metabolic process	0.0146103603481115	2	*Akr1c18, Wnt4*
182	GO:0031128	BP	developmental induction	0.0146103603481115	2	*Wnt4, Hoxd11*
183	GO:0045940	BP	positive regulation of steroid metabolic process	0.0151467803936729	2	*Apoa1, Wnt4*
184	GO:0032768	BP	regulation of monooxygenase activity	0.0154562626550282	2	*Snca, Agtr2*
185	GO:0010543	BP	regulation of platelet activation	0.0159296771111948	2	*Pdgfra, Abat*
186	GO:0030195	BP	negative regulation of blood coagulation	0.0164049686116784	2	*Pdgfra, Abat*
187	GO:1900047	BP	negative regulation of hemostasis	0.01688203791636	2	*Pdgfra, Abat*
188	GO:0050819	BP	negative regulation of coagulation	0.0172568337869221	2	*Pdgfra, Abat*

189	GO:1902930	BP	regulation of alcohol biosynthetic process	0.0172568337869221	2	*Snca, Wnt4*
190	GO:0051955	BP	regulation of amino acid transport	0.0184314110915359	2	*Snca, Abat*
191	GO:0046189	BP	phenol-containing compound biosynthetic process	0.0184568424652629	2	*Snca, Agtr2*
192	GO:0070527	BP	platelet aggregation	0.0188093643279148	2	*Pdgfra, Abat*
193	GO:0003044	BP	regulation of systemic arterial blood pressure mediated by a chemical signal	0.0192304838349291	2	*Tpm1, Agtr2*
194	GO:0015872	BP	dopamine transport	0.0210105841358118	2	*Snca, Abat*
195	GO:0030042	BP	actin filament depolymerization	0.0216413134138899	2	*Tpm1, Mical2*
196	GO:2001238	BP	positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	0.0216413134138899	2	*Unc5b, Agtr2*
197	GO:0010517	BP	regulation of phospholipase activity	0.0234576943308347	2	*Snca, Pdgfra*
198	GO:0051893	BP	regulation of focal adhesion assembly	0.0237077618346334	2	*Wnt4, Col16a1*
199	GO:0060193	BP	positive regulation of lipase activity	0.0237077618346334	2	*Pdgfra, Apoa1*
200	GO:0090109	BP	regulation of cell-substrate junction assembly	0.0237077618346334	2	*Wnt4, Col16a1*
201	GO:0001954	BP	positive regulation of cell-matrix adhesion	0.0238403675129483	2	*Wnt4, Col16a1*
202	GO:0032835	BP	glomerulus development	0.0238403675129483	2	*Pdgfra, Agtr2*
203	GO:0048008	BP	platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	0.0238403675129483	2	*Snca, Pdgfra*
204	GO:0045776	BP	negative regulation of blood pressure	0.0243276151704687	2	*Abat, Agtr2*
205	GO:0060688	BP	regulation of morphogenesis of a branching structure	0.0243276151704687	2	*Pdgfra, Agtr2*
206	GO:0030193	BP	regulation of blood coagulation	0.0248156110620004	2	*Pdgfra, Abat*
207	GO:0150116	BP	regulation of cell-substrate junction organization	0.0258068474591399	2	*Wnt4, Col16a1*
208	GO:1900046	BP	regulation of hemostasis	0.0258068474591399	2	*Pdgfra, Abat*
209	GO:0015800	BP	acidic amino acid transport	0.0262836493921288	2	*Snca, Abat*
210	GO:1902017	BP	regulation of cilium assembly	0.0262836493921288	2	*Mns1, Septin9*
211	GO:0030239	BP	myofibril assembly	0.0266502531528041	2	*Pdgfra, Tpm1*
212	GO:0050818	BP	regulation of coagulation	0.0266502531528041	2	*Pdgfra, Abat*

213	GO:0055002	BP	striated muscle cell development	0.027265307356615	2	*Pdgfra, Tpm1*
214	GO:0034308	BP	primary alcohol metabolic process	0.033112962492651	2	*Akr1c18, Wnt4*
215	GO:0043279	BP	response to alkaloid	0.033112962492651	2	*Snca, Abat*
216	GO:0050810	BP	regulation of steroid biosynthetic process	0.0344217758690327	2	*Akr1c18, Wnt4*
217	GO:0007568	BP	aging	0.0347758359368066	2	*Pmp22, Abat*
218	GO:0032272	BP	negative regulation of protein polymerization	0.0347758359368066	2	*Snca, Tpm1*
219	GO:0034109	BP	homotypic cell-cell adhesion	0.0347758359368066	2	*Pdgfra, Abat*
220	GO:1902117	BP	positive regulation of organelle assembly	0.0354335887996523	2	*Mns1, Septin9*
221	GO:0048041	BP	focal adhesion assembly	0.0360943476100981	2	*Wnt4, Col16a1*
222	GO:0033627	BP	cell adhesion mediated by integrin	0.0380940756968057	2	*Podxl, Col16a1*
223	GO:0006835	BP	dicarboxylic acid transport	0.0381201747243221	2	*Snca, Abat*
224	GO:0030168	BP	platelet activation	0.0401274162279288	2	*Pdgfra, Abat*
225	GO:0061053	BP	somite development	0.0414786141618403	2	*Plxna2, Wnt4*
226	GO:0007044	BP	cell-substrate junction assembly	0.0421579721195919	2	*Wnt4, Col16a1*
227	GO:0019217	BP	regulation of fatty acid metabolic process	0.0461007701318798	2	*Snca, Apoa1*
228	GO:0150115	BP	cell-substrate junction organization	0.0461007701318798	2	*Wnt4, Col16a1*
229	GO:0099565	BP	chemical synaptic transmission, postsynaptic	0.0467942089456737	2	*Snca, Abat*
230	GO:0090288	BP	negative regulation of cellular response to growth factor stimulus	0.0474897747803978	2	*Wnt4, Agtr2*
231	GO:2001237	BP	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	0.0479999251390278	2	*Unc5b, Lmna*
232	GO:0003300	BP	cardiac muscle hypertrophy	0.0493973473921171	2	*Lmna, Agtr2*
233	GO:0046889	BP	positive regulation of lipid biosynthetic process	0.0493973473921171	2	*Apoa1, Wnt4*
234	GO:0062023	CC	collagen-containing extracellular matrix	5.28613007621632e-4	6	*Pmp22, Sparc, Plxna2, Bgn, Col4a2, Col16a1*
235	GO:0043235	CC	receptor complex	0.0165237400121087	4	*Pmp22, Ptprb, Plxna2, Pdgfra*
236	GO:0001725	CC	stress fiber	0.0047715764673915	3	*Tpm1, Palld, Septin9*

237	GO:0097517	CC	contractile actin filament bundle	0.0047715764673915	3	*Tpm1, Palld, Septin9*
238	GO:0032432	CC	actin filament bundle	0.00559330890477133	3	*Tpm1, Palld, Septin9*
239	GO:0042641	CC	actomyosin	0.00559330890477133	3	*Tpm1, Palld, Septin9*
240	GO:0005604	CC	basement membrane	0.00716560435368035	3	*Pmp22, Sparc, Col4a2*
241	GO:0099568	CC	cytoplasmic region	0.0223213144008987	3	*Mns1, Cltb, Septin9*
242	GO:0005938	CC	cell cortex	0.0406685572256848	3	*Snca, Cltb, Septin9*
243	GO:0030133	CC	transport vesicle	0.0439484766047621	3	*Snca, Bgn, Cltb*
244	GO:0031253	CC	cell projection membrane	0.045316475139009	3	*Podxl, Tpm1, Cltb*
245	GO:0098644	CC	complex of collagen trimers	0.00579703997684516	2	*Col4a2, Col16a1*
246	GO:0031091	CC	platelet alpha granule	0.00633328183856884	2	*Sparc, Snca*
247	GO:0005581	CC	collagen trimer	0.033112962492651	2	*Col4a2, Col16a1*
248	GO:0030672	CC	synaptic vesicle membrane	0.033112962492651	2	*Snca, Cltb*
249	GO:0099501	CC	exocytic vesicle membrane	0.033112962492651	2	*Snca, Cltb*
250	GO:0016363	CC	nuclear matrix	0.0380940756968057	2	*Sparc, Lmna*
251	GO:0030667	CC	secretory granule membrane	0.0381201747243221	2	*Sparc, Snca*
252	GO:0005902	CC	microvillus	0.0479999251390278	2	*Podxl, Pdgfra*
253	GO:0003779	MF	actin binding	0.0048130274067352	5	*Klhl3, Snca, Tpm1, Mical2, Palld*
254	GO:0005201	MF	extracellular matrix structural constituent	0.00153120394291953	4	*Sparc, Bgn, Col4a2, Col16a1*
255	GO:0030020	MF	extracellular matrix structural constituent conferring tensile strength	0.012736959346602	2	*Col4a2, Col16a1*
256	GO:0050840	MF	extracellular matrix binding	0.0210105841358118	2	*Sparc, Bgn*
257	GO:0016709	MF	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	0.0248156110620004	2	*Akr1c18, Mical2*
258	GO:0016651	MF	oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H	0.0300353425562774	2	*Akr1c18, Mical2*
259	GO:0033293	MF	monocarboxylic acid binding	0.0401274162279288	2	*Akr1c18, Snca*

Tab. S8. Analiza funkcjonalna genów o zwiększonej ekspresji w komórkach ziarnistych myszy *ob/ob*.

Nr	Numer identyfikacyjny kategorii GO	Kategoria GO	Opis	Skorygowana wartość p	Liczba genów o zróżnicowanej ekspresji zaklasyfikowanych do danego procesu	Lista genów
1	GO:0061448	BP	connective tissue development	0.0470917446089607	4	*Otor, Bmp3, Dgat2, Bmpr2*
2	GO:0034502	BP	protein localization to chromosome	0.0355747327576111	3	*Tex15, Knl1, Wapl*
3	GO:0062014	BP	negative regulation of small molecule metabolic process	0.0355747327576111	3	*Dgat2, Dkk3, Fbp1*
4	GO:0032341	BP	aldosterone metabolic process	0.0355747327576111	2	*Ednrb, Dkk3*
5	GO:0008212	BP	mineralocorticoid metabolic process	0.0355747327576111	2	*Ednrb, Dkk3*