UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: Nauki biologiczne

mgr inż. Karolina Szymańska

Rozprawa doktorska

Rola wisfatyny w regulacji funkcji przedniego płata przysadki świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)

The effect of visfatin on the function of porcine pituitary gland (*Sus scrofa domestica* L.)

Praca wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt

Promotor: prof. dr hab. Tadeusz Kamiński,
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Promotor pomocniczy: dr Marta Kieżun
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2024

Praca finansowana z projektu badawczego NCN: 2018/31/B/NZ9/00781

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Rozprawa doktorska składa się z dwóch prac opublikowanych w 2023 roku, których tematyka dotyczy zagadnień związanych z wpływem wisfatyny na funkcje przysadki świni domowej w cyklu rujowym i wczesnej ciąży.

1. **Szymanska K,** Zaobidna E, Rytelewska E, Mlyczynska E, Kurowska P, Dobrzyn K, Kiezun M, Kaminska B, Smolinska N, Rak A, Kaminski T. 2023. Visfatin in the porcine pituitary gland: expression and regulation of secretion during the oestrous cycle and early pregnancy. Scientific Reports, 13 (1): 18253, DOI: 10.1038/s41598-023-45255-4 (IF[1] = 4.996; pkt.[2] = 140)

2. **Szymanska K,** Rytelewska E, Zaobidna E, Kiezun M, Gudelska M, Kopij G, Dobrzyn K, Mlyczynska E, Kurowska P, Kaminska B, Nynca A, Smolinska N, Rak A, Kaminski T. 2023. The Effect of Visfatin on the Functioning of the Porcine Pituitary Gland: An In Vitro Study. Cells, 12: 2835, DOI: 10.3390/cells12242835
(IF[1] = 6.0; pkt.[2] = 140)

Razem:

Liczba punktów MEiN: 280 pkt.

Szacunkowy sumaryczny IF: 10,996

[1]IF - wskaźnik Impact Factor czasopisma z 2023 roku.

[2]Liczba punktów wg Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 5 stycznia 2024 roku.

SPIS TREŚCI

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ 2

WYKAZ SKRÓTÓW 7

STRESZCZENIE 9

SUMMARY 12

1. WSTĘP 15

2. CEL I ZAKRES BADAŃ 17

3. MATERIAŁY I METODY 18

3.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE 18

3.2. BADANIE EKSPRESJI GENU WISFATYNY W PRZEDNIM I TYLNYM PŁACIE PRZYSADKI METODĄ REAL-TIME PCR 19

3.2.1. Izolacja RNA 19

3.2.3. Analiza real-time PCR 19

3.3. BADANIE KONCENTRACJI BIAŁKA WISFATYNY W PRZEDNIM I TYLNYM PŁACIE PRZYSADKI METODĄ WESTERN BLOT 21

3.3.1. Izolacja białka 21

3.3.2. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym 21

3.3.3. Analiza Western Blot 21

3.4. OKREŚLENIE KOLOKALIZACJI WISFATYNY Z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL I GH W PRZEDNIM PŁACIE PRZYSADKI METODĄ IMMUNOHISTOCHEMII FLUORESCENCYJNEJ 24

3.4.1. Przygotowanie preparatów tkankowych i barwienie skrawków 24

3.4.2. Analiza mikroskopowa preparatów 26

3.5. OKREŚLENIE WPŁYWU GnRH, FSH, LH I INSULINY NA ZAWARTOŚĆ I SEKRECJĘ BIAŁKA WISFATYNY 26

3.5.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki 26

3.5.2. Określenie zawartości białka wisfatyny w izolowanych komórkach przedniego płata przysadki metodą Western Blot 27

3.5.3. Oznaczanie stężenia wisfatyny w mediach hodowlanych metodą ELISA 27

3.6. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA SEKRECJĘ GONADOTROPIN PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI METODĄ ELISA . 27

3.6.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki 27

3.6.2. Oznaczanie stężeń LH i FSH w mediach hodowlanych metodą ELISA 28

3.7. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI 28

3.7.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki 28

3.7.2. Analiza Alamar Blue 28

3.8. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA APOPTOZĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI 29

3.8.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki 29

3.8.2. Cytometria przepływowa 29

3.9. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA AKTYWACJĘ SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 I AMPK W KOMÓRKACH PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI METODĄ WESTERN BLOT 30

3.9.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki 30

3.9.2. Określenie stężenia fosforylowanego i całkowitego białka INSR w mediach hodowlanych metodą ELISA 30

3.9.3. Analiza Western Blot 30

3.10. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY, ANTAGONISTY RECEPTORA INSULINY I INHIBITORÓW SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH NA SEKRECJĘ LH I FSH PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI METODĄ ELISA 33

3.10.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki 33

3.10.2. Oznaczanie stężeń LH i FSH w mediach hodowlanych metodą ELISA 33

3.11. ANALIZA STATYSTYCZNA 33

4. WYNIKI 35

4.1. EKSPRESJA GENU I KONCENTRACJA BIAŁKA WISFATYNY W PRZEDNIM I TYLNYM PŁACIE PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO I WCZESNEJ CIĄŻY 35

4.1.1. Ekspresja wisfatyny w przednim płacie przysadki 35

4.1.2. Ekspresja wisfatyny w tylnym płacie przysadki 35

4.2. KOLOKALIZACJA WISFATYNY Z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL I GH W PRZEDNIM PŁACIE PRZYSADKI W 10.-12. DNIU CYKLU RUJOWEGO 36

4.3. WPŁYW GnRH, LH, FSH I INSULINY NA KONCENTRACJĘ I SEKRECJĘ BIAŁKA WISFATYNY 36

4.4. WPŁYW WISFATYNY NA PODSTAWOWĄ I INDUKOWANĄ GnRH I/LUB INSULINĄ SEKRECJĘ GONADOTROPIN PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO 36

4.4.1. Podstawowa sekrecja LH 36

4.4.2. Indukowana GnRH sekrecja LH 37

4.4.3. Indukowana insuliną sekrecja LH 37

4.4.4. Indukowana GnRH i insuliną sekrecja LH 37

4.4.5. Podstawowa sekrecja FSH 38

4.4.6. Indukowana GnRH sekrecja FSH 38

4.4.7. Indukowana insuliną sekrecja FSH 38

4.4.8. Indukowana GnRH i insuliną sekrecja FSH 38

4.5. WPŁYW WISFATYNY NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO 39

4.6. WPŁYW WISFATYNY NA APOPTOZĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO 39

4.7. WPŁYW WISFATYNY NA AKTYWACJĘ SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 I AMPK W KOMÓRKACH PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W 10.-12. DNIU CYKLU RUJOWEGO 39

4.8. WPŁYW WISFATYNY, ANTAGONISTY RECEPTORA INSULINY I INHIBITORÓW SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH NA SEKRECJĘ LH I FSH PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI 40

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI 41

6. BIBLIOGRAFIA 42

7. SPIS TABEL 46

WYKAZ SKRÓTÓW

18sRNA: 18s rybosomalne RNA

ACTH: hormon adrenokortykotropowy

AKT/PI3K: kinaza 3-fosfatydyloinozytolu

AMPK: kinaza białkowa aktywowana 5'AMP

AP: przedni płat przysadki

BSA: albumina surowicy bydlęcej

CCR5: receptor C-C chemokin typu 5

DMPH: dorsomorfina, bloker szlaku AMPK

E_2: estradiol

F: starter sensowny

FSH: hormon folikulotropowy

GH: hormon wzrostu

GnRH: gonadoliberyna

hCG: ludzka gonadoliberyna kosmówkowa

HPG: oś podwzgórze-przysadka-gonady

INS: insulina

INSR: receptor insuliny

LH: hormon luteinizujący

LY294002: bloker szlaku AKT/PI3K

MAPK/ERK1/2: kinazy aktywowane mitogenami

NAMPT: wisfatyna, fosforybozylotransferaza nikotynamidoadeninowa

NP: tylny płat przysadki

P_4: progesteron

PBS: sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PGE_2: prostaglandyna E_2

$PGF_{2\alpha}$: prostaglandyna $F_{2\alpha}$

PRL: prolaktyna

R: starter antysensowny

S961: antagonista INSR

TSH: hormon tyreotropowy

U0126: bloker szlaku MAPK/ERK1/2

UBC: ubikwityna C

STRESZCZENIE

ROLA WISFATYNY W REGULACJI FUNKCJI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI ŚWINI DOMOWEJ (*SUS SCROFA DOMESTICA* L.)

mgr inż. Karolina Szymańska

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

Rozprawa doktorska składa się z dwóch prac opublikowanych w 2023 roku (1 – Scientific Reports, DOI: 10.1038/s41598-023-45255-4; 2 – Cells, DOI: 10.3390/cells12242835), których tematyka obejmuje ekspresję wisfatyny w przysadce świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w cyklu rujowym i wczesnej ciąży oraz wpływ wybranych hormonów na koncentrację i sekrecję wisfatyny. Ponadto, omówiono wpływ wisfatyny na sekrecję gonadotropin, apoptozę, proliferację i aktywację szlaków sygnałowych INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK w tym gruczole.

Przysadka odgrywa istotną rolę w kontrolowaniu podstawowych procesów biologicznych. Aktywność tego gruczołu jest regulowana przez liczne hormony oraz inne czynniki biologicznie aktywne, do których zaliczane są adipokiny. Do tej szerokiej grupy związków należy również wisfatyna, występująca w dwóch postaciach: zewnątrzkomórkowej i wewnątrzkomórkowej. Receptor wisfatyny nie został zidentyfikowany, jednak sugeruje się, że wisfatyna może wiązać i aktywować receptor insuliny (INSR), receptor chemokin CCR5 i toll-podobny receptor 4. Wisfatyna ulega ekspresji we wszystkich strukturach osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG): w podwzgórzu świni i myszy, w przysadce myszy, jak również w komórkach pęcherzykowych jajników kobiet i świni. Wisfatyna bierze udział w regulacji stanów zapalnych, różnicowania komórek i kontroli homeostazy energetycznej oraz wydaje się uczestniczyć w regulacji płodności u kobiet. Nie zbadano dotychczas wpływu wisfatyny na funkcje sekrecyjne przysadki.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej, zakładającej, że ekspresja genu i koncentracja białka wisfatyny w komórkach przysadki świni zależy od statusu hormonalnego zwierząt związanego z fazą cyklu rujowego i okresem wczesnej ciąży. Ponadto postawiono hipotezę zakładającą, że wisfatyna uczestniczy kontroli proliferacji i apoptozy komórek przysadki, a poprzez aktywację/inhibicję szlaków INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2

i AMPK wpływa na regulację funkcji sekrecyjnych komórek przysadki świni. Postawione hipotezy zweryfikowano poprzez:

1) ocenę poziomu ekspresji genu oraz koncentracji białka wisfatyny w komórkach przedniego (AP) i tylnego (NP) płata przysadki świni domowej w czterech fazach cyklu rujowego (2.-3., 10.-12., 14.-16., 17.-19. dzień cyklu) oraz czterech okresach wczesnej ciąży (10.-11., 12.-13., 15.-16., 27.-28. dzień ciąży) metodami real-time PCR i Western Blot;
2) określenie kolokalizacji wisfatyny z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL, GH w 10.-12. dniu cyklu rujowego metodą immunohistochemii fluorescencyjnej;
3) ocenę wpływu GnRH, LH, FSH i INS na koncentrację białka wisfatyny metodą Western Blot oraz na sekrecję adipokiny metodą ELISA;
4) ocenę wpływu wisfatyny w różnych stężeniach i/lub blokera wisfatyny FK866 na podstawową i indukowaną GnRH i/lub INS sekrecję LH i FSH przez komórki AP w czasie cyklu rujowego metodą ELISA;
5) określenie wpływu wisfatyny i jej blokera FK866 na proliferację i apoptozę komórek AP podczas fazach cyklu rujowego;
6) ocenę wpływu wisfatyny na aktywację/inhibicję szlaków sygnałowych INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK w komórkach AP w 10.-12. dniu cyklu rujowego metodą Western Blot;
7) określenie wpływu wisfatyny, antagonisty INSR i inhibitorów szlaków sygnałowych INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK na sekrecję LH i FSH przez komórki AP metodą ELISA.

W efekcie przeprowadzonych badań:

- wykazano, że ekspresja genu wisfatyny i koncentracja białka wisfatyny w AP i NP zależy od fazy cyklu rujowego i okresu wczesnej ciąży, co sugeruje związek ze statusem hormonalnym samic świń;
- stwierdzono kolokalizację wisfatyny z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL i GH w AP świni;
- potwierdzono wpływ GnRH, FSH, LH i INS na koncentrację i sekrecję białka wisfatyny;
- stwierdzono wpływ wisfatyny na podstawową oraz indukowaną GnRH i/lub INS sekrecję gonadotropin przez komórki AP;
- wykazano stymulujący wpływ wisfatyny na proliferację komórek AP;

- wykazano wpływ wisfatyny na aktywność ścieżek sygnałowych INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK w przysadce świń.

Otrzymane wyniki badań wskazują, że wisfatyna, poprzez wpływ na sekrecję gonadotropin, bierze udział w regulacji procesów rozrodczych loszek.

słowa kluczowe: wisfatyna, cykl rujowy, proliferacja, apoptoza, świnia

SUMMARY

THE EFFECT OF VISFATIN ON THE FUNCTION OF PORCINE PITUITARY GLAND (*SUS SCROFA DOMESTICA* L.)

Karolina Szymanska, M.Sc.

Doctoral thesis was carried out in the Department of Animal Anatomy and Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn under the guidance of prof. dr hab. Tadeusz Kaminski and dr Marta Kiezun.

The doctoral thesis comprises two papers published in 2023 (1 – Scientific Reports, DOI: 10.1038/s41598-023-45255-4; 2 – Cells, DOI: 10.3390/cells12242835), focused on the expression of visfatin in the pituitary gland of domestic pigs (*Sus scrofa domestica* L.) during the oestrous cycle and early pregnancy, the influence of selected hormones on the concentration and secretion of visfatin. Moreover, the effect of visfatin on gonadotropin secretion, apoptosis, proliferation and phosphorylation of INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 and AMPK in this gland is discussed.

The pituitary gland plays an important role in controlling basic biological processes. The activity of this gland is regulated by numerous hormones and other biologically active factors, including adipokines. This broad group of compounds also includes visfatin, which exists in two forms: extracellular and intracellular. The visfatin receptor has not been identified, however, it has been suggested that visfatin may bind and activate the insulin receptor (INSR), chemokine receptor CCR5 and toll-like receptor 4. Visfatin is expressed in all structures of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis (HPG): in the pig and mouse hypothalamus, in the mouse pituitary and the follicular cells of women and pig ovaries. Visfatin is involved in the regulation of inflammation, cell differentiation and control of energy homeostasis as well as appears to be involved in the regulation of female fertility. The effect of visfatin on the secretory functions of the pituitary gland has not yet been investigated.

The aim of this study was to verify the research hypothesis assuming that the gene expression and concentration of visfatin protein in pig pituitary depend on the hormonal status of the animals related to the phase of the estrous cycle and the period of early pregnancy. Moreover, a hypothesis was put forward that visfatin participates in the control of proliferation and apoptosis of pituitary cells, and by activating/inhibiting the INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 and AMPK signaling pathways, it influences the regulation of the secretory functions of pig pituitary cells. The hypotheses were verified by:

1) assessment of the level of gene expression and concentration of visfatin protein in the anterior (AP) and posterior (NP) pituitary of domestic pigs in four phases of the oestrous cycle (days 2-3, 10-12, 14-16, 17-19 of the cycle) and four periods of early pregnancy (days 10-11, 12-13, 15-16, 27-28 of pregnancy) using real-time PCR and Western Blot methods;
2) determination of visfatin colocalization with LH, FSH, ACTH, TSH, PRL and GH on days 10-12 of the oestrous cycle by fluorescence immunohistochemistry;
3) assessment of the influence of GnRH, LH, FSH and INS on the concentration of visfatin protein by Western Blot and on the secretion of the adipokine by ELISA;
4) assessment of the visfatin effect in various concentrations and/or the visfatin blocker FK866 on basal and GnRH and/or INS-induced LH and FSH secretion by AP cells during the oestrous cycle using ELISA method;
5) determination of the effect of visfatin and its blocker FK866 on the proliferation and apoptosis of AP cells during the oestrous cycle;
6) assessment of the visfatin effect on the activation/inhibition of INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 and AMPK signaling pathways in AP cells on days 10-12 of the oestrous cycle by Western Blot;
7) determination of the visfatin effect, an INSR antagonist and inhibitors of the INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 and AMPK signaling pathways on the secretion of LH and FSH by AP cells by ELISA.

As a result of the research conducted:

- it was shown that the expression of the visfatin gene and the concentration of visfatin protein in AP and NP depend on the phase of the oestrous cycle and the period of early pregnancy, which suggests a relationship with the hormonal status of female pigs;
- visfatin was found to colocalize with LH, FSH, ACTH, TSH, PRL and GH in AP;
- the influence of GnRH, FSH, LH and INS on the concentration and secretion of visfatin protein was confirmed;
- the effect of visfatin on the basal and GnRH and/or INS-induced secretion of gonadotrophins by AP cells was found;
- visfatin has been shown to have a stimulating effect on the proliferation of AP cells;
- the effect of visfatin on the activity of INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 and AMPK signaling pathways in the porcine pituitary was found.

The obtained research results indicate that visfatin, by influencing the secretion of gonadotrophins, is involved in the regulation of reproductive processes in gilts.

keywords: visfatin, oestrous cycle, proliferation, apoptosis, pig

1. WSTĘP

Przysadka odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu podstawowych procesów biologicznych u ludzi i zwierząt, w tym wzrostu, metabolizmu i reprodukcji (AMAR i in., 2003). W rezultacie zakłócenia w funkcjonowaniu tego gruczołu mogą prowadzić do zaburzeń hormonalnych i metabolicznych (HONG i in., 2016). Aktywność przysadki jest regulowana głównie przez sprzężenia zwrotne w obrębie osi endokrynnych, takich jak podwzgórze-przysadka-gonady (HPG), wykorzystujących wydzielane przez te struktury hormony (AMAR i in., 2003). Jednakże wpływ na funkcje tego gruczołu mogą mieć także inne czynniki aktywne biologicznie. Coraz większa liczba badań sugeruje, że należą do nich adipokiny – grupa związków wytwarzanych głównie przez tkankę tłuszczową (ESTIENNE i in., 2019). Jedną z takich adipokin jest wisfatyna, znana również jako fosforybozylotransferaza nikotynamidoadeninowa (NAMPT) (WANG i in., 2021). Wisfatyna została zidentyfikowana w 2005 roku przez FUKUHARĘ i in. Jest wielofunkcyjnym białkiem o masie 56 kDa, które występuje w dwóch postaciach: zewnątrzkomórkowej (eNAMPT), pełniącej funkcję hormonu i wewnątrzkomórkowej (iNAMPT) – enzymu, który bierze udział w syntezie dinukleotydu nikotynamidoadeniny. Receptor wisfatyny nie został jak dotąd zidentyfikowany, jednak sugeruje się, że wisfatyna może wiązać i aktywować INSR (GROLLA i in., 2016). Ponadto receptor chemokin CCR5 (VAN DEN BERGH i in., 2012) i toll-podobny receptor 4 (ROMACHO i in., 2020) są uważane za potencjalne receptory tej adipokiny.

Wisfatyna, poza tkanką tłuszczową, jest wytwarzana również w układzie rozrodczym, w tym w jajnikach kobiet (REVERCHON i in., 2013; SHEN i in., 2010), bawołów (THAKRE i in., 2021) i świń (MLYCZYŃSKA i in., 2023A; MLYCZYŃSKA i in., 2023B). Jej synteza poddana jest kontroli hormonalnej. W komórkach ziarnistych kobiet ekspresja *NAMPT* była stymulowana hCG i PGE_2 (SHEN i in., 2010). Podobnie w naszych badaniach odnotowaliśmy, zależny od fazy cyklu rujowego, wpływ gonadotropin, prostaglandyn $PGF_{2\alpha}$, INS, P_4 i E_2 na syntezę wisfatyny przez komórki lutealne, ziarniste i osłonki wewnętrznej świń (MLYCZYŃSKA i in., 2023A; MLYCZYŃSKA i in., 2023B).

Wisfatyna odgrywa ważną rolę w regulacji stanów zapalnych, różnicowania komórek (PAVLOVÁ i in., 2015) i angiogenezy (ADYA i in., 2008; LOVREN i in., 2009). Biorąc udział w kontroli homeostazy energetycznej, wydaje się uczestniczyć również w regulacji płodności. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem wisfatyny w płynie pęcherzykowym jajników kobiet i liczbą pobranych oocytów (SHEN i in., 2010). Podobnie u myszy, wisfatyna zwiększała potencjał rozrodczy i kompetencje rozwojowe oocytów (CHOI i in., 2012).

Prawdopodobnym jest, że efekt ten został w pewnym stopniu osiągnięty poprzez udział wisfatyny w regulacji steroidogenezy jajnikowej (REVERCHON i in., 2013; REVERCHON i in., 2016; THAKRE i in., 2021). W naszych badaniach wykazaliśmy wpływ wisfatyny na sekrecję hormonów steroidowych przez komórki lutealne świń. Działanie wisfatyny było zależne od fazy cyklu, w której izolowano komórki oraz obecności w hodowli gonadotropin i INS.

Wydaje się, że wisfatyna poza bezpośrednim wpływem na układ rozrodczy może dodatkowo oddziaływać na wyższe struktury osi HPG. Jej ekspresję stwierdzono w podwzgórzu świń (KAMIŃSKI i in., 2021) i myszy (GUIA i in., 2020), w przysadce myszy, jak również w mysiej linii komórek gonadotropowych LβT2 (MAILLARD i in., 2017). Ekspresję genu wisfatyny stwierdzono również u owiec w części guzowatej przysadki, która odpowiada za hormonalną regulację sezonowości u tych zwierząt (DUPRÉ i in., 2008). Wydaje się, że również stan hormonalny związany z ciążą może wpływać na produkcję wisfatyny – zaawansowaniu ciąży u kobiet towarzyszył wzrost stężenia wisfatyny w osoczu (MASTORAKOS i in., 2007).

Znajomość roli wisfatyny w kontroli funkcji przysadki jest znikoma. Jedyne publikacje z tym związane wskazują na hamujący wpływ adipokiny na wydzielanie LH przez komórki linii LβT2 (MAILLARD i in., 2017). Brakuje publikacji opartych na obserwacji wpływu wisfatyny na komórki przysadki zarówno ludzi, jak i zwierząt gospodarskich.

2. CEL I ZAKRES BADAŃ

Dostępne dane na temat roli wisfatyny u ssaków, a zwłaszcza jej zaangażowania w regulację rozrodu samic, nie są kompletne i wymagają głębszych badań. Ponadto wiedza na temat wpływu wisfatyny na funkcje wydzielnicze komórek przysadki jest bardzo ograniczona. Wspomniane luki w wiedzy były inspiracją do przeprowadzenia kompleksowych badań nad wpływem wisfatyny na funkcjonowanie przysadki świni domowej, w tym wydzielanie przez nią gonadotropin mających kluczowe znaczenie w kontroli układu rozrodczego. Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej, zakładającej, że ekspresja genu i koncentracja białka wisfatyny w komórkach przysadki świni zależy od statusu hormonalnego zwierząt związanego z fazą cyklu rujowego i okresem wczesnej ciąży. Ponadto postawiono hipotezę zakładającą, że wisfatyna uczestniczy w kontroli proliferacji i apoptozy komórek przysadki, a poprzez aktywację/inhibicję szlaków INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK wpływa na regulację funkcji sekrecyjnych komórek przysadki świni. Postawione hipotezy zweryfikowano poprzez:

1) ocenę poziomu ekspresji genu oraz koncentracji białka wisfatyny w komórkach AP i NP świni domowej w czterech fazach cyklu rujowego (w 2.-3., 10.-12., 14.-16., 17.-19. dniu cyklu) oraz czterech okresach wczesnej ciąży (w 10.-11., 12.-13., 15.-16., 27.-28. dniu ciąży) metodami real-time PCR i Western Blot;
2) określenie kolokalizacji wisfatyny z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL, GH w 10.-12. dniu cyklu rujowego metodą immunohistochemii fluorescencyjnej;
3) ocenę wpływu GnRH, LH, FSH i INS na koncentrację białka wisfatyny metodą Western Blot oraz na sekrecję adipokiny metodą ELISA;
4) ocenę wpływu wisfatyny w różnych stężeniach i/lub blokera wisfatyny FK866 na podstawową i indukowaną GnRH i/lub INS sekrecję LH i FSH przez komórki AP w czasie cyklu rujowego metodą ELISA;
5) określenie wpływu wisfatyny i jej blokera FK866 na proliferację i apoptozę komórek AP w czasie cyklu rujowego;
6) ocenę wpływu wisfatyny na aktywację/inhibicję szlaków sygnałowych INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK w komórkach AP w 10.-12. dniu cyklu rujowego metodą Western Blot;
7) określenie wpływu wisfatyny, antagonisty INSR i inhibitorów szlaków sygnałowych AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK na sekrecję LH i FSH przez komórki AP metodą ELISA.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE

Do przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń wykorzystano przysadki pochodzące od dojrzałych płciowo loszek świni domowej w wieku 7-8 miesięcy i masie ciała 130-150 kg, przeznaczonych do uboju komercyjnego i przetwórstwa mięsnego.

Przysadki pobrano od loszek (n = 5 na grupę) w określonych fazach cyklu rujowego:

- 2.-3. dzień cyklu rujowego (faza wczesnolutealna, okres formowania się ciałek żółtych);
- 10.-12. dzień cyklu rujowego (faza środkowolutealna, okres, w którym występują w pełni funkcjonalne ciałka żółte);
- 14.-16. dzień cyklu rujowego (faza późnolutealna, okres luteolizy);
- 17.-19. dzień cyklu rujowego (faza pęcherzykowa);
- 10.-11. dzień ciąży (migracja zarodków w macicy);
- 12.-13. dzień ciąży (matczyne rozpoznanie ciąży);
- 15.-16. dzień ciąży (początek implantacji);
- 27.-28. dzień ciąży (zakończenie implantacji).

Przysadki przeznaczone do zbadania poziomu ekspresji genu i koncentracji białka wisfatyny po pobraniu natychmiast zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80ºC do czasu izolacji RNA i białka w celu przeprowadzenia dalszych analiz.

Tkanki pobrane w 10.-12. dniu cyklu rujowego, przeznaczone do barwienia immunofluorescencyjnego, umieszczono w 4% paraformaldehydzie (pH = 7,4, 4°C).

Przysadki przeznaczone do hodowli *in vitro* pobrano i umieszczono w zimnym buforze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami Dulbecco (DPBS), zawierającym antybiotyki, a następnie przetransportowano do laboratorium.

Ruję (dzień zerowy cyklu) wykrywano obserwując zachowanie loszek w obecności knura. Fazę cyklu rujowego potwierdzono na podstawie morfologii jajników według AKINSA i MORRISSETTE'A (1968). W przypadku loszek ciężarnych naturalną inseminację przeprowadzano w 1.-2. dniu cyklu rujowego, a pierwszy dzień po kopulacji został oznaczony jako pierwszy dzień ciąży. Ciąża była potwierdzana obecnością zarodków w obu rogach macicy.

3.2. BADANIE EKSPRESJI GENU WISFATYNY W PRZEDNIM I TYLNYM PŁACIE PRZYSADKI METODĄ REAL-TIME PCR

3.2.1. Izolacja RNA

Całkowite RNA wyizolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Merck, Niemcy) zgodnie z instrukcjami producenta. Ilość i jakość wyizolowanego RNA określono spektrofotometrycznie (Infinite M200 Pro, Tecan, Szwajcaria). Czystość RNA zmierzono na podstawie stosunku wartości pomiarów A260/A280 oraz 260/230, a otrzymane wartości mieściły się w przedziale, odpowiednio, 1,8-2,0 i 1,8 lub więcej.

3.2.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Wyizolowane RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Omniscript RT Kit (Qiagen, Niemcy). Mieszanina reakcyjna zawierała: odwrotną transkryptazę (4 jednostki/reakcję), bufor RT (2 µl), mieszaninę deoksyrybotrifosfonukleotydów (dNTP; po 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), startery Oligo-dT (0,5 µg/reakcję; Roche, Niemcy), inhibitor RNAz (10 jednostek/reakcję; Life Technologies, USA) oraz RNA (1 µg) w całkowitej objętości 20 µl. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze przez 1 godzinę w temperaturze 37°C, a następnie przez 5 minut w 93°C.

3.2.3. Analiza real-time PCR

Analiza PCR w czasie rzeczywistym została przeprowadzona przy użyciu systemu AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, USA). Mieszanina reakcyjna składała się z: cDNA (20 ng), Power SYBR Green Master Mix (12,5 µl; Applied Biosystems Inc., USA), specyficznych par starterów, które opisano szczegółowo w Tabeli 1. oraz wody wolnej od nukleaz (Ambion, USA) w całkowitej objętości 20 µl. *UBC* i *18sRNA* zastosowano jako geny referencyjne. Kontrole negatywne zamiast cDNA zawierały wodę wolną od nukleaz. Wszystkie reakcje amplifikowano w dwóch powtórzeniach. Warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 1. Do potwierdzenia specyficzności amplifikacji wykorzystano analizę krzywej topnienia. Względny poziom ekspresji genów obliczono przy użyciu metody komparatywnej ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) i znormalizowano przy użyciu średnich geometrycznych poziomów ekspresji genów referencyjnych.

Tabela 1. Charakterystyka starterów użytych w badaniach

GEN	SEKWENCJE STARTERÓW	NUMER DOSTĘPU	STĘŻENIE (nM)	WARUNKI REAKCJI	ŹRÓDŁO
NAMPT	F: 5′-CCAGTTGCTGATCCCAACAAA-3′ R: 5′-AAATTCCCTCCTGGTGTCCTATG-3′	XM_003132281.5	300	wstępna denaturacja i aktywacja enzymu: • 95°C, 10 min. 40 cykli: • denaturacji: 95°C, 15 s • przyłączania: 60°C, 1 min.	(SZESZKO i in., 2016)
UBC	F: 5′-GGAGGAATCTACTGGGGCGG-3′ R: 5′-CAGAAGAAACGCAGGCAAACT-3′	XM_003483411.3	400	wstępna denaturacja i aktywacja enzymu: • 95°C, 10 min. 40 cykli: • denaturacji: 95°C, 15 s • denaturacji: 95°C, 15 s • wydłużania: 72°C, 1 min.	(SMOLINSKA i in., 2019)
18sRNA	F: 5′-TCCAATGGATCCTCGCGGAA-3′ R: 5′-GGCTACCACATCCAAGGAAG-3′	AY265350.1	400		

NAMPT: gen wisfatyny; *UBC:* gen ubikwityny C; *18sRNA*: gen 18s rybosomalnego RNA; F: starter sensowny; R: starter antysensowny

3.3. BADANIE KONCENTRACJI BIAŁKA WISFATYNY W PRZEDNIM I TYLNYM PŁACIE PRZYSADKI METODĄ WESTERN BLOT

3.3.1. Izolacja białka

Izolację białka z przednich i tylnych płatów przysadki przeprowadzono przy użyciu odczynnika do ekstrakcji białek tkankowych (T-PER; Thermo Fisher Scientific, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Koncentrację białka oznaczono metodą Bradforda. Absorbancję prób zmierzono przy długości fali λ=595 nm, a całkowitą zawartość białka odczytano z krzywej wzorcowej powstałej w oparciu o wartości absorbancji znanych rozcieńczeń standardu BSA. Próby przechowywano w -80°C do czasu wykonania dalszych analiz.

3.3.2. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym

Rozdział elektroforetyczny białek (SDS-PAGE) w ilości 30 µg w każdej próbie przeprowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym przy natężeniu prądu 30 mA/żel (200 V, 1-3 W) przez około 2 godziny.

3.3.3. Analiza Western Blot

Transfer białek rozdzielonych podczas elektroforezy przeprowadzono metodą półsuchą (SEMI-DRY) na membrany PVDF (Merck, Niemcy) o średnicy porów 0,45 µm. Miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał zablokowano w 5% BSA w buforowanej Trisem soli fizjologicznej z dodatkiem 0,1% TWEEN® 20 (TBST; Merck, Niemcy) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem było płukanie membran 3×5 min w buforze TBST w celu pozbycia się nadmiaru czynnika blokującego. Następnie membrany inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych przez całą noc w 4°C (specyfikację przeciwciał zastosowanych w badaniu przedstawiono szczegółowo w Tabeli 2.). Aktyna posłużyła jako białko referencyjne. Po całonocnej inkubacji membrany ponownie płukano tak, jak opisano wyżej w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał. Następnie membrany inkubowano w roztworze przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (HRP) przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej (RT). Po tym czasie membrany wypłukano z nadmiaru niezwiązanych przeciwciał. Kompleksy immunoenzymatyczne wizualizowano przy użyciu Immobilon Western Chemiluminescent HRP Western blot Luminol Reagent (Advansta Inc., USA) i archiwizowano przy użyciu systemu ChemidocTM XRS + (BioRad Laboratories Inc., USA). Membrany poddano analizie densytometrycznej przy użyciu

oprogramowania ImageJ (Narodowe Instytuty Zdrowia USA, USA). Dane wyrażono jako stosunek białka wisfatyny do białka aktyny w umownych jednostkach gęstości optycznej.

Tabela 2. Specyfikacja przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych stosowanych podczas analizy Western Blot

	PRZECIWCIAŁA	**POCHODZENIE**	**PRODUCENT, KRAJ I NUMER KATALOGOWY**	**ROZCIEŃCZENIE**
I-RZĘDOWE	anty-wisfatynowe	królik	Abcam, UK, ab233294	1:700
	anty-aktynowe	mysz	Merck, Niemcy, A5316	1:5000
	PRZECIWCIAŁA	**ZNACZNIK**	**PRODUCENT, KRAJ I NUMER KATALOGOWY**	**ROZCIEŃCZENIE**
II-RZĘDOWE	kozie anty-królicze	HRP	Cell Signaling Technology, USA, 7074	1:1000
	końskie anty-mysie	HRP	Cell Signaling Technology, USA, 7076	1:1000

3.4. OKREŚLENIE KOLOKALIZACJI WISFATYNY Z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL I GH W PRZEDNIM PŁACIE PRZYSADKI METODĄ IMMUNOHISTOCHEMII FLUORESCENCYJNEJ

3.4.1. Przygotowanie preparatów tkankowych i barwienie skrawków

Utrwalone w paraformaldehydzie przysadki (n = 3) zatopiono w parafinie, a następnie pocięto na skrawki o grubości 5 μm i naniesiono na szkiełka podstawowe. W celu odsłonięcia miejsc antygenowych, skrawki gotowano w roztworze Antigen Retrieval Solution (Thermofisher Scientific, USA). Ograniczenie nieswoistego barwienia tła osiągnięto przez inkubację skrawków z 50 mM NH_4Cl w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS). Następnie skrawki permeabilizowano przy użyciu 0,1% Triton™ X-100 (Merck, Niemcy) i nieswoiste miejsca wiązania przeciwciał blokowano poprzez 1,5-godzinną inkubację z buforem blokującym surowicy rybiej (Thermo Fisher Scientific, USA). Następnie preparaty płukano 0,1 M PBS i inkubowano z odpowiednimi kombinacjami przeciwciał pierwszorzędowych, a następnie z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z barwnikami fluorescencyjnymi Alexa Fluor® 488 lub Alexa Fluor® 594 (specyfikacja przeciwciał zastosowanych w badaniu została szczegółowo przedstawiona w Tabeli 3.). W przypadku kontroli negatywnej pominięto przeciwciała pierwszorzędowe i szkiełka inkubowano z 0,1 M PBS. Niespecyficzne wybarwienie tła zostało zmniejszone przez inkubację szkiełek w 0,5% roztworze Sudan Black w 70% alkoholu etylowym. Otrzymane preparaty wysuszono na powietrzu i pokryto histologicznym medium do zatapiania preparatów Fluoroshield™ (Merck, Niemcy) zawierającym 4’,6-diamidyno-2-fenyloindol (DAPI) do barwienia kontrastującego jąder komórkowych.

Tabela 3. Specyfikacja przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych stosowanych podczas immunofluorescencji

	PRZECIWCIAŁA	**GATUNEK**	**PRODUCENT, KRAJ I NUMER KATALOGOWY**	**ROZCIEŃCZENIE**
I-RZĘDOWE	anty-wisfatynowe	królik	Abcam, UK, ab233294	1:150
	anty-LH	mysz	Abcam, UK, ab212578	1:200
	anty-FSH	mysz	Abcam, UK, ab233866	1:150
	anty-ACTH	mysz	Abcam, UK, ab212736	1:500
	anty-TSH	mysz	R&D, USA, MAB57941	1:200
	anty-PRL	mysz	Abcam, UK, ab11301	1:200
	anty-GH	mysz	Abcam, UK, ab218405	1:200
	PRZECIWCIAŁA	**TYP SPRZĘŻONEGO FLUOROFORU**	**PRODUCENT, KRAJ I NUMER KATALOGOWY**	**ROZCIEŃCZENIE**
II-RZĘDOWE	kozie anty-królicze	Alexa Fluor® 488	Jackson ImmunoResearch Labs, UK, 111-545-003	1:1000
	końskie anty-mysie	Alexa Fluor® 594	Jackson ImmunoResearch Labs, UK, 115-585-003	1:1000

3.4.2. Analiza mikroskopowa preparatów

Wyznakowane skrawki analizowano przy użyciu mikroskopu Olympus BX51 (Olympus, Japonia) wyposażonego w iluminator fluorescencyjny EXFO x-CiteSeries 120Q (Excelitas Technologies Corp., USA) z odpowiednim zestawem filtrów dla barwników DAPI i Alexa Fluor®. Zdjęcia wykonano przy użyciu cyfrowego aparatu mikroskopowego Nikon DS-Qi2 (Nikon, Japonia) i oprogramowania do obrazowania NIS-Elements (Nikon, Japonia).

3.5. OKREŚLENIE WPŁYWU GnRH, FSH, LH I INSULINY NA ZAWARTOŚĆ I SEKRECJĘ BIAŁKA WISFATYNY

3.5.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki

Komórki AP wyizolowano zgodnie z metodą opisaną przez KIEŻUN i in. (2014) z kilkoma modyfikacjami. Izolację komórek przeprowadzono poprzez trawienie wcześniej pociętej uprzednio na małe kawałki tkanki 0,2% kolagenazą (Merck, Niemcy) w temperaturze 37°C przez 30 min. Uzyskane w ten sposób komórki AP przeniesiono do probówek o pojemności 15 ml zawierających medium DMEM i odwirowano trzykrotnie przy 1000×g w RT przez 10 minut. Po każdym wirowaniu usuwano supernatant, a komórki zawieszano w świeżym medium. Następnie komórki trawiono cyklicznie 0,2% kolagenazą (Merck, Niemcy) i 0,25% pankreatyną (Merck, Niemcy) przez 10 minut, aż do rozproszenia całej tkanki. Po każdym cyklu trawienia uwolnione komórki zbierano i płukano świeżym medium DMEM, jak opisano powyżej. Następnie zawiesinę komórek przepuszczono przez filtr o średnicy oczek 70 µm w celu usunięcia niestrawionych fragmentów tkanki. Liczbę wyizolowanych komórek AP oszacowano za pomocą hemocytometru, a żywotność zbadano stosując błękit trypanu (Merck, Niemcy). Żywotność uzyskanych komórek AP w każdym przypadku wynosiła >90%. Wyizolowane komórki zawieszono w medium McCoy's 5A (Merck, Niemcy), zawierającym 10% surowicy końskiej (Merck, Niemcy) i 2,5% płodowej surowicy cielęcej (Merck, Niemcy). Komórki wysiano na 6-dołkowe płytki hodowlane ($1,5\times10^6$ komórek/2 ml/dołek) i poddano preinkubacji przez 48 godzin (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza). Następnie do każdej studzienki dodano świeże, wolne od surowicy medium McCoy's 5A i kontynuowano preinkubację przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie medium usunięto i dodano świeże, pozbawione surowicy medium McCoy's 5A. Komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza) w obecności czynników: GnRH (100 ng/ml), LH (100 ng/ml), FSH (100 ng/ml) lub INS (10 ng/ml). Komórki hodowane bez dodatku czynników wykorzystano jako próby

kontrolne. Stężenia GnRH i INS wybrano, odpowiednio, na podstawie KIEZUN i in., 2014 oraz GAVIN i in., 1974. Stężenia LH i FSH zostały wybrane na podstawie pracy GREGORASZCZUK i in. (2003). Potencjalny wpływ badanych czynników na żywotność komórek AP określono za pomocą testu Alamar Blue, który wykazał, że zastosowane czynniki nie miały toksycznego wpływu na hodowane komórki AP. Po inkubacji medium zebrano i odwirowano przy 1000×g, a supernatanty przechowywano w -20°C do czasu przeprowadzenia analiz ELISA. Z komórek wyizolowano białko za pomocą T-PER (Thermo Fisher Scientific, USA) tak, jak opisano w rozdziale 3.3.1., a uzyskane izolaty przechowywano w -80°C do czasu analizy Western Blot.

3.5.2. Określenie zawartości białka wisfatyny w izolowanych komórkach przedniego płata przysadki metodą Western Blot

Zawartość białka wisfatyny w komórkach AP określono metodą Western Blot. Analiza ta została przeprowadzona zgodnie w opisem przedstawionym w rozdziałach 3.3.3. i 3.3.2. (specyfikację przeciwciał zastosowanych w tym badaniu przedstawiono szczegółowo w Tabeli 2.).

3.5.3. Oznaczanie stężenia wisfatyny w mediach hodowlanych metodą ELISA

Do ilościowego określenia koncentracji białka wisfatyny w medium hodowlanym wykorzystano komercyjne zestawy ELISA (nr kat. MBS736963, MyBioSource, USA) zgodnie z protokołem producenta. Wartości absorbancji mierzono przy długości fali λ=450 nm, używając czytnika mikropłytek ELx808 ELISA i oprogramowania KC Junior (BioTek Instruments, USA). Wewnątrzseryjne i międzyseryjne współczynniki zmienności dla przeprowadzonej analizy wyniosły, odpowiednio, 6,03% i 6,17%.

3.6. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA SEKRECJĘ GONADOTROPIN PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI METODĄ ELISA

3.6.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki

Hodowla *in vitro* komórek AP została przeprowadzona zgodnie z opisem podanym w punkcie 3.5.1. z kilkoma wyjątkami. Komórki wysiano na 24-dołkowe płytki hodowlane ($2{,}5\times10^5$ komórek/1 ml/dołek) i poddano preinkubacji przez 48 godzin (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza). Następnie do każdej studzienki dodano 1 ml świeżego, pozbawionego surowicy medium McCoy's 5A i kontynuowano preinkubację przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie medium usunięto i dodano świeże, pozbawione surowicy medium McCoy's 5A. Komórki

inkubowano przez kolejne 24 godziny (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza) w obecności czynników: wisfatyny (1, 10, 100 ng/ml) i/lub blokera wisfatyny FK866 (10 nM). Komórki hodowane bez dodatku badanych czynników wykorzystano jako próby kontrolne. Potencjalny wpływ badanych czynników na żywotność komórek określono za pomocą testu Alamar Blue, który wykazał, że zastosowane stężenia wisfatyny i FK866 nie miały toksycznego wpływu na hodowane komórki AP. Po inkubacji zebrano medium i odwirowano przy 1000×g, a supernatanty przechowywano w -20°C do czasu przeprowadzenia analiz metodą ELISA.

3.6.2. Oznaczanie stężeń LH i FSH w mediach hodowlanych metodą ELISA

Koncentrację gonadotropin w mediach hodowlanym oznaczono przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA specyficznych dla LH (nr kat. EP0105; FineTest, Chiny) i FSH (nr kat. EP0060; FineTest, Chiny) zgodnie z protokołami producenta. Wartości absorbancji mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ=450 nm, używając aparatu Infinite M200 PRO Reader z oprogramowaniem Tecan i-Control 1.8 (Tecan, Szwajcaria). Wewnątrzseryjne i międzyseryjne współczynniki zmienności dla przeprowadzonej analizy wyniosły 2,69% i 6,58% dla LH oraz 3,16% i 7,34% dla FSH.

3.7. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI

3.7.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki

Hodowla *in vitro* komórek AP została przeprowadzona zgodnie z opisem zawartym w punkcie 3.5.1. z jednym wyjątkiem. Komórki wysiano na 96-dołkowe płytki hodowlane (1×10^5 komórek/100 µl/dołek) i poddano preinkubacji przez 48 godzin (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza). Następnie do każdej studzienki dodano świeże, wolne od surowicy medium McCoy's 5A i kontynuowano preinkubację przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie medium usunięto, a do dołków dodano świeże, pozbawione surowicy medium McCoy's 5A. Komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza) w obecności czynników: wisfatyny (1, 10, 100 ng/ml) i/lub FK866 (10 nM). Dodatkowo, komórki hodowane bez dodatku czynników wykorzystano jako próby kontrolne.

3.7.2. Analiza Alamar Blue

Proliferację komórek AP oceniano przy użyciu testu Alamar Blue® (Thermo Fisher Scientific, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. Po zakończeniu hodowli *in vitro*

zmierzono absorbancję medium w każdym dołku 96-dołkowej płytki przy dwóch długościach fali, λ=570 nm (A570) i λ=600 nm (A600), używając spektrofotometru Infinite M200 Pro (Tecan, Szwajcaria). Procentową różnicę w redukcji barwnika Alamar Blue przez inkubowane komórki, obliczono przez porównanie stosunku (A570-A600)/(A600) wartości absorbancji skorygowanej o tło dla próbek z grup stymulowanych czynnikami oraz dla próbek z grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki odzwierciedlały aktywność metaboliczną komórek i wskazywały wynikającą z niej tendencję do proliferacji. Wartości bliskie 100% interpretowano jako wskazujące na brak zmian w proliferacji komórek (względem kontroli), wartości powyżej 100% uznawano za wskazujące na stymulację proliferacji komórek, a wartości poniżej 100% uznawano za wskazujące na zahamowanie proliferacji komórek.

3.8. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA APOPTOZĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI

3.8.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki

Hodowla *in vitro* komórek AP została przeprowadzona zgodnie z opisem podanym w punkcie 3.5.1. z kilkoma wyjątkami. Próby, które miały posłużyć za pozytywną kontrolę procesu apoptozy preinkubowano w obecności kamptotecyny w koncentracji 4 µg/ml. Po okresie inkubacji media usunięto, a do dołków dodano świeże, pozbawione surowicy medium McCoy's 5A. Komórki inkubowano przez następne 24 godziny (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza) w obecności badanych czynników: wisfatyny (1, 10, 100 ng/ml) i/lub FK866 (10 nM) oraz kamptotecyny (pozytywna kontrola procesu apoptozy). Dodatkowo, komórki hodowane bez dodatku czynników wykorzystano jako próby kontrolne.

3.8.2. Cytometria przepływowa

Intensywność procesu apoptozy komórek AP określono z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej. W celu zbadania tego procesu wykorzystano zestaw Swine Annexin V-Fluorescein Apoptosis Assay (Immuno-Chemistry Technologies, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. Do znakowania komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy zastosowano aneksynę V wyznakowaną fluoresceiną, natomiast barwienie jodkiem propidyny (PI) zastosowano do wykrywania komórek w późnym stadium apoptozy, a także komórek martwych. Pozytywną kontrolę dla procesu apoptozy stanowiły komórki stymulowane kamptotecyną (Merck, Niemcy) zgodnie z zaleceniami w producenta. W celu przeprowadzenia analizy medium usunięto natychmiast po zakończeniu hodowli *in vitro*, a komórki oddzielono

od płytki za pomocą 0,05% trypsyny-EDTA (Merck, Niemcy). Komórki następnie przemyto dwukrotnie w PBS i odwirowano przy 1000×g przez 5 minut w RT. Następnie komórki zawieszono w buforze wiążącym na bazie wapnia i traktowano aneksyną i PI. Pomiary przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACSCelesta™ (BD Biosciences, USA). W każdej z prób przeprowadzono analizę dla 20 000 zdarzeń. Dane zebrano i przeanalizowano stosując oprogramowanie FACSDiva 9.0 (BD Biosciences, USA).

3.9. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY NA AKTYWACJĘ SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 I AMPK W KOMÓRKACH PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI METODĄ WESTERN BLOT

3.9.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki

Hodowla *in vitro* komórek AP została przeprowadzona zgodnie z opisem podanym w punkcie 3.5.1. z kilkoma wyjątkami. Po preinkubacji medium usunięto, a do dołków dodano świeże, pozbawione surowicy medium McCoy's 5A. Komórki inkubowano w obecności wisfatyny (10 ng/ml) przez kolejne 2, 5, 10 i 30 min (37°C, 5% CO2, 95% powietrza). Dodatkowo, komórki hodowane bez dodatku wisfatyny wykorzystano jako próby kontrolne.

3.9.2. Określenie stężenia fosforylowanego i całkowitego białka INSR w mediach hodowlanych metodą ELISA

Aktywację szlaku INSR oceniano poprzez ilościowe oznaczenie całkowitego stężenia INSR (total-INSR) i stężenia jego formy fosforylowanej (fosfo-INSR) w ekstraktach białkowych przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA (EIA09483p: total-INSR; EIA05929p: fosfo-INSR). Test przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Wartości absorbancji mierzono przy długości fali λ=450 nm, używając czytnika Infinite M200 Pro z oprogramowaniem Tecan i-control™ 1.8 (Tecan, Szwajcaria). Wewnątrzseryjne współczynniki zmienności dla przeprowadzonej analizy wyniosły 1,57% dla fosfo-INSR i 1,63% dla całkowitego-INSR. Stosunek stężeń fosfo-INSR do całkowitego-INSR dla każdej próbki z tej samej ekstrakcji zinterpretowano jako poziom aktywacji szlaku.

3.9.3. Analiza Western Blot

Aktywację szlaków sygnałowych AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK określono poprzez zbadanie zawartości białek specyficznych dla szlaku i ich fosforylowanych form

za pomocą techniki Western Blot, jak opisano w punktach 3.3.2. i 3.3.3. z kilkoma wyjątkami. Do analizy użyto po 10 µg białka na studzienkę. Próby rozdzielono na 12,5% żelach poliakryloamidowych. Następnie białka przeniesiono na membrany PVDF o średnicy porów 0,45 µm (Merck, Niemcy) metodą transferu półsuchego (warunki dla dwóch żeli: 12 V, 5 A, 12 min), stosując urządzenie Invitrogen Power Blotter Station (Thermo Fisher Scientific, USA). W kolejnym etapie procedury membrany blokowano w 5% BSA w TBST (Merck, Niemcy) przez 1 godzinę. Po zakończeniu blokowania bloty wypłukano 3×5 min w buforze TBST i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi (specyfikację przeciwciał przedstawiono szczegółowo w Tabeli 4.) Po całonocnej inkubacji, bloty wypłukano i inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi przez 1,5 godziny w RT. Kompleksy immunoenzymatyczne wykrywano metodą chemiluminescencji przy użyciu odczynnika Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck, Niemcy), zgodnie z instrukcjami producenta. Następnie membrany analizowano i archiwizowano przy użyciu systemu obrazowania Azure 280 (Azure Biosystems, USA). Zidentyfikowane białka określono ilościowo za pomocą analizy densytometrycznej przy użyciu oprogramowania Image Studio™ Lite v. 5.2 (LI-COR Biosciences, USA). Stosunek ilości fosforylowanego białka, specyficznego dla danego szlaku, do zawartości jego postaci niefosforylowanej (całkowitej) dla każdej próbki z tej samej ekstrakcji zinterpretowano jako poziom aktywacji szlaku.

Tabela 4. Specyfikacja przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych stosowanych podczas analizy Western Blot

	PRZECIWCIAŁA	**PRODUCENT, KRAJ I NUMER KATALOGOWY**	**ROZCIEŃCZENIE**
I-RZĘDOWE	anty-AKT	Cell Signaling Technology, USA, 9272	1:1000
	anty-fosfo-AKT	Cell Signaling Technology, USA, 9271	1:1000
	anty-MAPK	Cell Signaling Technology, USA, 9102	1:1000
	anty-fosfo-MAPK	Cell Signaling Technology, USA, 9101	1:1000
	anty-AMPK	Cell Signaling Technology, USA, 2532	1:1000
	anty-fosfo-AMPK	Cell Signaling Technology, USA, 2531	1:1000
	PRZECIWCIAŁA	**PRODUCENT, KRAJ I NUMER KATALOGOWY**	**ROZCIEŃCZENIE**
II-RZĘDOWE	kozie anty-królicze skoniugowane z HRP	Merck, Niemcy, AP156P	1:10 000

3.10. OKREŚLENIE WPŁYWU WISFATYNY, ANTAGONISTY RECEPTORA INSULINY I INHIBITORÓW SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH NA SEKRECJĘ LH I FSH PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI METODĄ ELISA

3.10.1. Hodowla *in vitro* komórek przedniego płata przysadki

Hodowla *in vitro* komórek AP została przeprowadzona zgodnie z opisem podanym w punkcie 3.6.1. z kilkoma wyjątkami. Po preinkubacji medium usunięto, a do dołków dodano świeże, pozbawione surowicy medium McCoy's 5A. Komórki inkubowano przez kolejne 24 godziny (37°C, 5% CO_2, 95% powietrza) w obecności badanych czynników: wisfatyny (10 ng/ml) i/lub antagonisty INSR (S961; 1 μM), i/lub blokera szlaku AKT/PI3K (LY294002; 20 μM), i/lub blokera szlaku MAPK/ERK1/2 (U0126; 10 μM) i/lub blokera szlaku AMPK (DMPH; 10 μM). Dodatkowo, komórki hodowane bez dodatku czynników wykorzystano jako próby kontrolne. Potencjalny wpływ badanych czynników na żywotność komórek określono za pomocą testu Alamar Blue, który nie wykazał ich toksycznego wpływu na komórki AP. Po inkubacji medium zebrano i odwirowano przy 1000×g, a supernatanty przechowywano w - 20°C do czasu przeprowadzenia analiz ELISA.

3.10.2. Oznaczanie stężeń LH i FSH w mediach hodowlanych metodą ELISA

Koncentrację gonadotropin w mediach hodowlanym oznaczono dokładnie jak opisano w punkcie 3.6.2.

3.11. ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statistica (StatSoft Inc., USA). Wszystkie dane sprawdzono pod kątem normalności rozkładu (test Shapiro-Wilka) i jednorodności wariancji (test Levene'a).

Do analizy koncentracji transkryptów i białek wisfatyny w AP i NP oraz wpływu GnRH, LH, FSH i INS na koncentrację i sekrecję wisfatyny przez komórki AP wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post hoc Tukey'a.

Wyniki dotyczące wydzielania LH i FSH analizowano za pomocą wieloczynnikowej analizy ANOVA z czterema zmiennymi niezależnymi (czynnikami głównymi): fazą, stymulacją komórek, stężeniami wisfatyny i FK866 oraz interakcją tych czynników. Następnie zastosowano dwuczynnikową analizę ANOVA oraz test *post hoc* Duncana w celu zbadania różnic w wydzielaniu gonadotropin dla każdej konfiguracji eksperymentu i fazy cyklu rujowego.

Wpływ głównych czynników, tj. fazy, stężenia wisfatyny i FK866 oraz interakcję tych czynników na proliferację komórek zbadano za pomocą wieloczynnikowej analizy ANOVA. Następnie określono różnice między grupami dla każdego układu eksperymentalnego i fazy cyklu za pomocą dwuczynnikowej analizy ANOVA oraz testu *post hoc* Duncana.

W celu zbadania wpływu wisfatyny *in vitro* na proces apoptozy, zastosowano analizę dwuczynnikową ANOVA, a następnie test *post hoc* Duncana.

Aktywacja szlaków sygnałowych INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK została zbadana przez zastosowanie jednoczynnikowej analizy ANOVA w celu określenia, zależnego od czasu, wpływu wisfatyny na komórki AP.

Do określenia wpływu wisfatyny *in vitro* na poziom wydzielania LH i FSH w obecności inhibitorów szlaków sygnałowych wykorzystano analizę wieloczynnikową ANOVA, a następnie test *post hoc* Dunnett'a. W analizie tej uwzględniono pięć zmiennych niezależnych (czynniki główne): wisfatyna i inhibitory szlaków S961, LY294002, U0126, DMPH oraz interakcje między tymi czynnikami.

Wszystkie dane eksperymentalne przedstawiono jako średnie ± błąd standardowy średniej (S.E.M.) eksperymentów przeprowadzonych w pięciu powtórzeniach ($n = 5$). Za istotne statystycznie uznano różnice pomiędzy badanymi grupami, gdy wartości $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. EKSPRESJA GENU I KONCENTRACJA BIAŁKA WISFATYNY W PRZEDNIM I TYLNYM PŁACIE PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO I WCZESNEJ CIĄŻY

4.1.1. Ekspresja wisfatyny w przednim płacie przysadki

Najwyższą ekspresję genu wisfatyny w czasie cyklu rujowego odnotowano w 10.-12. dniu. Z kolei w 17.-19. dniu cyklu ekspresja spadła w porównaniu do dni 10.-12. i 14.-16. (publikacja 1., rycina 1A).

Podczas ciąży zaobserwowano niższą ekspresję *NAMPT* w 15.-16. dniu w porównaniu z dniami 12.-13. i 27.-28. (publikacja 1., rycina 1B).

Porównanie ekspresji genu wisfatyny między okresami wczesnej ciąży a fazą środkowolutealną cyklu rujowego wskazuje, że zawartość mRNA wisfatyny w AP we wszystkich badanych okresach ciąży była niższa (publikacja 1., rycina 1C).

W czasie cyklu rujowego największą koncentrację białka wisfatyny zaobserwowano w 14.-16. dniu, natomiast najniższą w 17.-19. dniu cyklu (publikacja 1., rycina 1D).

W czasie ciąży koncentracja białka wisfatyny była niższa w 12.-13. dniu w porównaniu z dniami 10.-11. i 27.-28. (publikacja 1., rycina 1E).

Porównując okresy wczesnej ciąży z fazą środkowolutealną cyklu rujowego, stwierdzono istotnie wyższą koncentrację białka wisfatyny w 27.-28. dniu ciąży (publikacja 1., rycina 1F).

4.1.2. Ekspresja wisfatyny w tylnym płacie przysadki

W czasie cyklu rujowego najwyższą ekspresję genu wisfatyny zaobserwowano w 2.-3. dniu. Niższą ekspresję *NAMPT* odnotowano w dniach 14.-16. i 17.-19., natomiast najniższą w 10.-12. dniu (publikacja 1., rycina 2A).

W czasie ciąży koncentracja mRNA wisfatyny była najniższa w 12.-13. dniu cyklu (publikacja 1., rycina 2B).

Porównanie okresów wczesnej ciąży i fazy środkowolutealnej cyklu rujowego wskazuje, że zawartość mRNA wisfatyny we wszystkich okresach ciąży była niższa (publikacja 1., rycina 2C).

W czasie cyklu rujowego najniższą koncentrację białka wisfatyny zaobserwowano w 2.-3. dniu (publikacja 1., rycina 2D).

W czasie ciąży ekspresja białka wisfatyny była stała we wszystkich badanych okresach (publikacja 1., rycina 2E).

Nie zaobserwowano różnic w koncentracji białka wisfatyny pomiędzy okresami wczesnej ciąży a fazą środkowolutealną cyklu rujowego (publikacja 1., rycina 2F).

4.2. KOLOKALIZACJA WISFATYNY Z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL I GH W PRZEDNIM PŁACIE PRZYSADKI W 10.-12. DNIU CYKLU RUJOWEGO

Obecność białka wisfatyny zaobserwowano w komórkach gonadotropowych, kortykotropowych, tyreotropowych, laktotropowych i somatotropowych (publikacja 1., ryciny 3 i 4).

4.3. WPŁYW GnRH, LH, FSH I INSULINY NA KONCENTRACJĘ I SEKRECJĘ BIAŁKA WISFATYNY

W 2.-3. dniu cyklu rujowego jedynie LH zwiększało koncentrację i wydzielanie białka wisfatyny w komórkach przedniego płata przysadki (publikacja 1., rycina 5A, 5E). W 10.-12. dniu cyklu rujowego żaden z badanych hormonów nie wpływał na koncentrację i wydzielanie białka wisfatyny (publikacja 1., rycina 5B, 5F). W 14.-16. dniu cyklu rujowego żaden z badanych hormonów nie miał wpływu na koncentrację wisfatyny (publikacja 1., rycina 5C), a jedynie GnRH stymulowało wydzielanie wisfatyny (publikacja 1., rycina 5G). W 17.-19. dniu cyklu rujowego nie stwierdzono wpływu badanych hormonów na koncentrację białka wisfatyny (publikacja 1., rycina 5D), natomiast każdy z nich stymulował wydzielanie wisfatyny (publikacja 1., rycina 5H).

4.4. WPŁYW WISFATYNY NA PODSTAWOWĄ I INDUKOWANĄ GnRH I/LUB INSULINĄ SEKRECJĘ GONADOTROPIN PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO

4.4.1. Podstawowa sekrecja LH

Stwierdzono, że wisfatyna we wszystkich badanych stężeniach zwiększała podstawowe wydzielanie LH w fazach wczesnolutealnej i pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 1A i 1D).

Wisfatyna w stężeniach 1 i 10 ng/ml również zwiększała podstawowe wydzielanie LH w fazie środkowolutealnej (publikacja 2., rycina 1B). Z kolei w fazie późnolutealnej wisfatyna w stężeniu 100 ng/ml spowodowała zmniejszenie podstawowego wydzielania LH (publikacja 2., rycina 1C).

4.4.2. Indukowana GnRH sekrecja LH

Stymulowane GnRH wydzielanie LH wzrosło w odpowiedzi na wisfatynę w stężeniu 10 i 100 ng/ml w fazie pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 2D). Z kolei wydzielanie LH stymulowane GnRH było tłumione przez wisfatynę we wszystkich badanych stężeniach w fazie wczesno- i późnolutealnej (publikacja 2., rycina 2A i 2C). W fazie środkowolutealnej wisfatyna w stężeniach 1 i 100 ng/ml zmniejszała stymulowane GnRH wydzielanie LH (publikacja 2., rycina 2B).

4.4.3. Indukowana insuliną sekrecja LH

Stwierdzono, że wisfatyna w stężeniu fizjologicznym (10 ng/ml) zwiększała wydzielanie LH stymulowane przez INS w fazie wczesnolutealnej (publikacja 2., rycina 3A). Wisfatyna w stężeniach 10 i 100 ng/ml zwiększała również stymulowane przez INS wydzielanie LH w fazie środkowolutealnej (publikacja 2., rycina 3B). Wisfatyna we wszystkich badanych stężeniach zwiększała stymulowane przez INS wydzielanie LH w fazie pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 3D). Natomiast w fazie późnolutealnej wisfatyna w stężeniach 10 i 100 ng/ml zmniejszała stymulowane przez INS wydzielanie LH (publikacja 2., rycina 3C).

4.4.4. Indukowana GnRH i insuliną sekrecja LH

Wisfatyna we wszystkich badanych stężeniach zwiększała wydzielanie LH stymulowane GnRH i INS w fazie pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 4D). Z kolei wisfatyna we wszystkich badanych stężeniach zmniejszała wydzielanie LH stymulowane GnRH i INS w fazie lutealnej (publikacja 2., rycina. 4A, 4B i 4C).

Należy również zauważyć, że nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w podstawowym i stymulowanym GnRH i/lub INS wydzielaniu LH w obecności blokera wisfatyny FK866 (publikacja 2., ryciny 1–4). Stężenia wydzielanego pod wpływem blokera FK866 LH były porównywalne ze stężeniami obserwowanymi w odpowiadających grupach kontrolnych. Wspólne użycie wisfatyny i jej blokera FK866 niwelowało wpływ wisfatyny do poziomu kontroli.

4.4.5. Podstawowa sekrecja FSH

Podstawowe wydzielanie FSH zostało zwiększone przez wisfatynę użytą w najwyższym stężeniu podczas fazy pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 5D). Wisfatyna w stężeniach 10 i 100 ng/ml zmniejszała podstawowe wydzielanie FSH w fazie wczesnolutealnej (publikacja 2., rycina 5A). Podobnie wisfatyna w najwyższym stężeniu hamowała podstawowe wydzielanie FSH w fazie środkowolutealnej (publikacja 2., rycina 5B) i nie miała wpływu na uwalnianie gonadotropiny w fazie późnolutealnej (publikacja 2., rycina 5C).

4.4.6. Indukowana GnRH sekrecja FSH

Stymulowane GnRH wydzielanie FSH było zwiększone w obecności wisfatyny w stężeniach 10 i 100 ng/ml podczas fazy pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 6D). Natomiast wydzielanie FSH stymulowane GnRH było zmniejszone przez najwyższe stężenie wisfatyny w fazach wczesno- i środkowolutealnej (publikacja 2., rycina 6A i 6B). W fazie późnolutealnej wpływ wisfatyny był statystycznie nieistotny (publikacja 2., rycina 6C).

4.4.7. Indukowana insuliną sekrecja FSH

Wisfatyna w stężeniu 100 ng/ml zwiększała stymulowane przefz INS wydzielanie FSH w fazie pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 7D). Z kolei wydzielanie FSH indukowane INS zostało obniżone przez wisfatynę w najwyższym stężeniu w fazie środkowolutealnej (publikacja 2., rycina 7B). W dwóch pozostałych fazach cyklu nie odnotowano znaczącego wpływu wisfatyny (publikacja 2., rycina 7A i 7C).

4.4.8. Indukowana GnRH i insuliną sekrecja FSH

Wisfatyna w stężeniach 10 i 100 ng/ml zwiększała wydzielanie FSH stymulowane GnRH i INS w fazie pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 8D). W fazie wczesnolutealnej, wisfatyna w stężeniach 10 i 100 ng/ml zmniejszała stymulowane GnRH i INS wydzielanie FSH (publikacja 2., rycina 8A). Najwyższe stężenie wisfatyny hamowało wydzielanie FSH stymulowane GnRH i INS w fazie środkowolutealnej (publikacja 2., rycina 8B). Nie zaobserwowano wpływu wisfatyny w fazie późnolutealnej (publikacja 2., rycina 8C).

Nie zaobserwowano żadnych zmian w podstawowym i stymulowanym GnRH i/lub INS wydzielaniu FSH w obecności blokera wisfatyny FK866. Dodany samodzielnie bloker wisfatyny FK866 nie miał wpływu na wydzielanie FSH, ale znacząco hamował wpływ wisfatyny na uwalnianie tej gonadotropiny (publikacja 2., ryciny 5-8).

4.5. WPŁYW WISFATYNY NA PROLIFERACJĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO

Wisfatyna w koncentracji 10 i 100 ng/ml pobudzała proliferację komórek AP w fazach wczesno- i środkowolutealnej (publikacja 2., rycina 9A i 9B), natomiast w stężeniu 100 ng/ml wykazywała podobne działanie w fazach późnolutealnej i pęcherzykowej (publikacja 2., rycina 9C i 9D).

Nie zaobserwowano żadnych zmian w proliferacji komórek AP pod wpływem blokera wisfatyny FK866. Z kolei jednoczesne zastosowanie wisfatyny i FK866 tłumiło stymulujący wpływ wisfatyny na proliferację komórek AP do poziomu kontroli (publikacja 2., rycina 9).

4.6. WPŁYW WISFATYNY NA APOPTOZĘ KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W CZASIE CYKLU RUJOWEGO

Wisfatyna i/lub bloker wisfatyny FK866 nie miały wpływu na proces apoptozy komórek AP (publikacja 2., rycina 10A-C). Nie zaobserwowano również wpływu wisfatyny i/lub blokera wisfatyny FK866 na liczbę martwych komórek (publikacja 2., rycina 10D).

4.7. WPŁYW WISFATYNY NA AKTYWACJĘ SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 I AMPK W KOMÓRKACH PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI W 10.-12. DNIU CYKLU RUJOWEGO

Zaobserwowano, że wzrost zawartości fosfo-INSR nastąpił w 10 minucie hodowli z dodatkiem wisfatyny, osiągając szczytową wartość po 30 minutach (publikacja 2., rycina 11A).

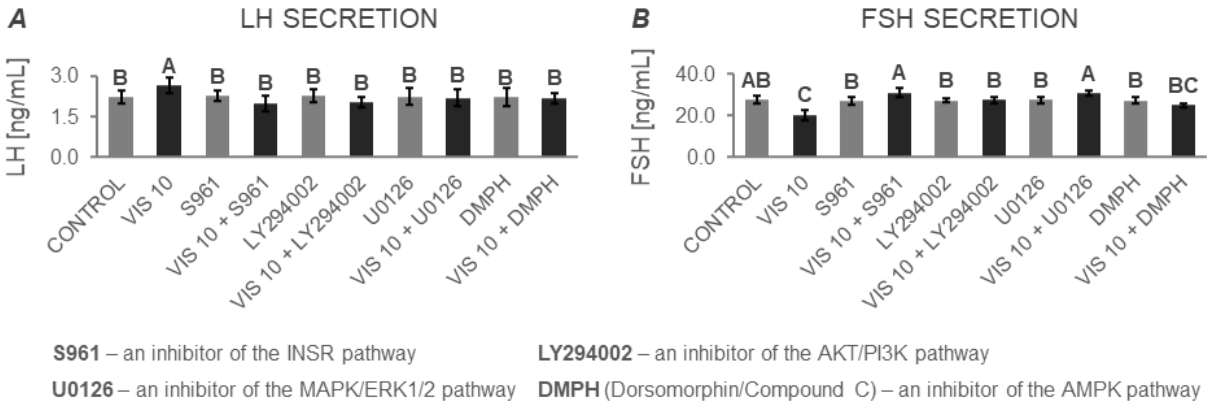
W przypadku fosfo-AKT wzrost jego zawartości zaobserwowano już po 2 minutach stymulacji wisfatyną, przy czym najwyższą ekspresję fosfo-AKT odnotowano po 5 minutach inkubacji w obecności wisfatyny. Ekspresja fosfo-AKT powróciła do początkowego poziomu po 10 minutach hodowli (publikacja 2., rycina 11B).

Wzrost fosforylacji MAPK zaobserwowano po 2 i 5 minutach stymulacji wisfatyną, a ekspresja fosfo-MAPK powróciła do poziomu wyjściowego po 10 minutach inkubacji (publikacja 2., rycina 11C).

Z kolei w przypadku AMPK, zaobserwowano spadek fosforylacji po 5, 10 i 30 minutach stymulacji wisfatyną (publikacja 2., rycina 11D).

4.8. WPŁYW WISFATYNY, ANTAGONISTY RECEPTORA INSULINY I INHIBITORÓW SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH NA SEKRECJĘ LH I FSH PRZEZ KOMÓRKI PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI

Wisfatyna stymulowała wydzielanie LH (publikacja 2., rycina 12A) oraz hamowała wydzielanie FSH (publikacja 2., rycina 12B). Działanie wisfatyny zostało zablokowane pod wpływem blokerów szlaków INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK (publikacja 2., rycina 12A i 12B). Wyniki te wskazują, że wisfatyna może działać na komórki przedniego płata przysadki świń przez wszystkie badane szlaki sygnałowe.



W streszczeniu pracy doktorskiej (jej części polskojęzycznej) prezentujemy poprawną wersję rysunku 12, taką jaka była wysłana do redakcji czasopisma Cells i jaka również była elementem odesłanej do redakcji szczotki artykułu. Z powodów niezależnych od autorów rysunek 12 (podpisy słupków) zostały zmienione przez redakcję Cells.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Otrzymane wyniki, poza udziałem wisfatyny w kontroli apoptozy komórek AP, pozytywnie zweryfikowały postawione hipotezy oraz poszerzyły dotychczasową wiedzę na temat funkcjonowania przysadki świń. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono:

1) występowanie mRNA i białka wisfatyny w AP i NP świni, co sugeruje jej lokalną syntezę i możliwy auto-/parakrynny wpływ na gruczoł;
2) zmiany ekspresji genu i koncentracji białek wisfatyny w obu płatach przysadki świni podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży, co sugeruje, że ekspresja wisfatyny w badanym gruczole jest zależna od statusu hormonalnego zwierzęcia;
3) obecność wisfatyny w komórkach gonadotropowych, tyreotropowych, somatotropowych, laktotropowych i kortykotropowych świni;
4) wpływ GnRH, FSH, LH i insuliny na koncentrację i sekrecję białka wisfatyny;
5) zależny od fazy cyklu (statusu endokrynnego zwierzęcia) wpływ wisfatyny na podstawową i indukowaną GnRH i/lub insuliną sekrecję gonadotropin, co może wskazywać na pośredni udział adipokiny w kontroli układu rozrodczego;
6) stymulujący wpływ wisfatyny na proliferację komórek przedniego płata przysadki i brak oddziaływania na apoptozę;
7) wpływ wisfatyny na aktywację/hamowanie szlaków sygnałowych INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERL1/2 i AMPK, które zaangażowane są w sekrecję gonadotropin, co sugeruje, że adipokina może oddziaływać na komórki AP poprzez te szlaki sygnałowe.

Uzyskane wyniki wskazują na zaangażowanie wisfatyny w kontrolę funkcji przysadki świń sugerując jednocześnie, poprzez wpływ na uwalnianie gonadotropin, jej udział w regulacji procesów rozrodczych.

6. BIBLIOGRAFIA

Adya, R., Tan, B. K., Punn, A., Chen, J., Randeva, H. S. (2008). Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. *Cardiovascular Research*, *78*(2), 356–365. DOI: 10.1093/cvr/cvm111

Akins, R., Morrissette, J. (1968). Gross ovarian changes during estrous cycle of swine. *American Journal of Veterinary Research*, *29*, 1953–1957.

Amar, A. P., Weiss, M. H. (2003). Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurgery Clinics of North America*, *14*(1), 11–23. DOI: 10.1016/S1042-3680(02)00017-7

Choi, K.-H., Joo, B.-S., Sun, S.-T., Park, M.-J., Son, J.-B., Joo, J.-K., Lee, K.-S. (2012). Administration of visfatin during superovulation improves developmental competency of oocytes and fertility potential in aged female mice. *Fertility and Sterility*, *97*(5), 1234–1241.e3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.02.032

Dupré, S. M., Burt, D. W., Talbot, R., Downing, A., Mouzaki, D., Waddington, D., Malpaux, B., Davis, J. R. E., Lincoln, G. A., Loudon, A. S. I. (2008). Identification of melatonin-regulated genes in the ovine pituitary pars tuberalis, a target site for seasonal hormone control. *Endocrinology*, *149*(11), 5527–5539. DOI: 10.1210/EN.2008-0834

Estienne, A., Bongrani, A., Reverchon, M., Ramé, C., Ducluzeau, P.-H., Froment, P., Dupont, J. (2019). Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18), 4431. DOI: 10.3390/ijms20184431

Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanabe, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y., Shimomura, I. (2005). Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat That Mimics the Effects of Insulin. *Science*, *307*(5708), 426–430. DOI: 10.1126/science.1097243

Gavin, J. R., Roth, J., Neville, D. M., De Meyts, P., Buell, D. N. (1974). Insulin-Dependent Regulation of Insulin Receptor Concentrations: A Direct Demonstration in Cell Culture.

Proceedings of the National Academy of Sciences, *71*(1), 84–88. DOI: 10.1073/pnas.71.1.84

Gregoraszczuk, E.Ł, Wójtowicz, A. K., Ptak, A., Nowak, K. (2003). In vitro effect of leptin on steroids' secretion by FSH- and LH-treated porcine small, medium and large preovulatory follicles. *Reproductive Biology*, *3*, 227–239.

Grolla, A. A., Travelli, C., Genazzani, A. A., Sethi, J. K. (2016). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase, a new cancer *metabokine*. *British Journal of Pharmacology*, *173*(14), 2182–2194. DOI: 10.1111/bph.13505

Guia, R. M., Hassing, A. S., Skov, L. J., Ratner, C., Plucińska, K., Madsen, S., Diep, T. A., Dela Cruz, G. V., Trammell, S. A. J., Sustarsic, E. G., Emanuelli, B., Gillum, M. P., Gerhart-Hines, Z., Holst, B., Treebak, J. T. (2020). Fasting- and ghrelin-induced food intake is regulated by NAMPT in the hypothalamus. *Acta Physiologica*, *228*(4). DOI: 10.1111/apha.13437

Hong, G. K., Payne, S. C., Jane, J. A. (2016). Anatomy, Physiology, and Laboratory Evaluation of the Pituitary Gland. *Otolaryngologic Clinics of North America*, *49*(1), 21–32. DOI: 10.1016/j.otc.2015.09.002

Kaminski, T., Kiezun, M., Zaobidna, E., Dobrzyn, K., Wasilewska, B., Mlyczynska, E., Rytelewska, E., Kisielewska, K., Gudelska, M., Bors, K., Kopij, G., Szymanska, K., Kaminska, B., Rak, A., Smolinska, N. (2021). Plasma level and expression of visfatin in the porcine hypothalamus during the estrous cycle and early pregnancy. *Scientific Reports*, *11*(1). DOI: 10.1038/S41598-021-88103-Z

Kiezun, M., Smolinska, N., Maleszka, A., Dobrzyn, K., Szeszko, K., Kaminski, T. (2014). Adiponectin expression in the porcine pituitary during the estrous cycle and its effect on LH and FSH secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *307*(11), E1038–E1046. DOI: 10.1152/ajpendo.00299.2014

Lovren, F., Pan, Y., Shukla, P. C., Quan, A., Teoh, H., Szmitko, P. E., Peterson, M. D., Gupta, M., Al-Omran, M., Verma, S. (2009). Visfatin activates eNOS via Akt and MAP kinases and improves endothelial cell function and angiogenesis in vitro and in vivo: translational implications for atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *296*(6), E1440–E1449. DOI: 10.1152/ajpendo.90780.2008

Maillard, V., Elis, S., Desmarchais, A., Hivelin, C., Lardic, L., Lomet, D., Uzbekova, S., Monget, P., Dupont, J. (2017). Visfatin and resistin in gonadotroph cells: expression, regulation of LH secretion and signalling pathways. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*(12), 2479. DOI: 10.1071/RD16301

Mastorakos, G., Valsamakis, G., Papatheodorou, D. C., Barlas, I., Margeli, A., Boutsiadis, A., Kouskouni, E., Vitoratos, N., Papadimitriou, A., Papassotiriou, I., Creatsas, G. (2007). The Role of Adipocytokines in Insulin Resistance in Normal Pregnancy: Visfatin Concentrations in Early Pregnancy Predict Insulin Sensitivity. *Clinical Chemistry*, *53*(8), 1477–1483. DOI: 10.1373/clinchem.2006.084731

Mlyczyńska, E., Kurowska, P., Rytelewska, E., Zaobina, E., Pich, K., Kieżun, M., Dobrzyń, K., Kisielewska, K., Kopij, G., Smolińska, N., Kamiński, T., Rak, A. (2023A). Expression of visfatin in the ovarian follicles of prepubertal and mature gilts and in vitro effect of gonadotropins, insulin, steroids, and prostaglandins on visfatin levels. *Theriogenology*, *211*, 28–39. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.07.040

Mlyczyńska, E., Zaobidna, E., Rytelewska, E., Dobrzyń, K., Kieżun, M., Kopij, G., Szymańska, K., Kurowska, P., Dall'Aglio, C., Smolińska, N., Kamiński, T., Rak, A. (2023B). Expression and regulation of visfatin/NAMPT in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Animal Reproduction Science*, *250*, 107212. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2023.107212

Pavlová, T., Novák, J., Bienertová-Vašků, J. (2015). The role of visfatin (PBEF/Nampt) in pregnancy complications. *Journal of Reproductive Immunology*, *112*, 102–110. DOI: 10.1016/j.jri.2015.09.004

Reverchon, M., Cornuau, M., Cloix, L., Rame, C., Guerif, F., Royere, D., Dupont, J. (2013). Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Molecular Human Reproduction*, *19*(5), 313–326. DOI: 10.1093/molehr/gat002

Reverchon, M., Rame, C., Bunel, A., Chen, W., Froment, P., Dupont, J. (2016). VISFATIN (NAMPT) Improves in Vitro IGF1-Induced Steroidogenesis and IGF1 Receptor Signaling Through SIRT1 in Bovine Granulosa Cells1. *Biology of Reproduction*, *94*(3). DOI: 10.1095/biolreprod.115.134650

Romacho, T., Valencia, I., Ramos-González, M., Vallejo, S., López-Esteban, M., Lorenzo, O., Cannata, P., Romero, A., San Hipólito-Luengo, A., Gómez-Cerezo, J. F., Peiró, C., Sánchez-Ferrer, C. F. (2020). Visfatin/eNampt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Scientific Reports*, *10*(1), 5386. DOI: 10.1038/s41598-020-62190-w

Shen, C.-J., Tsai, E.-M., Lee, J.-N., Chen, Y.-L., Lee, C.-H., Chan, T.-F. (2010). The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. *Fertility and Sterility*, *93*(6), 1844–1850. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.090

Smolinska, N., Kiezun, M., Dobrzyn, K., Rytelewska, E., Kisielewska, K., Gudelska, M., Zaobidna, E., Bogus-Nowakowska, K., Wyrebek, J., Bors, K., Kopij, G., Kaminska, B., Kaminski, T. (2019). Expression of Chemerin and Its Receptors in the Porcine Hypothalamus and Plasma Chemerin Levels during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 3887. DOI: 10.3390/ijms20163887

Szeszko, K., Smolinska, N., Kiezun, M., Dobrzyn, K., Maleszka, A., Kaminski, T. (2016). The influence of adiponectin on the transcriptomic profile of porcine luteal cells. *Functional Integrative Genomics*, *16*(2), 101–114. DOI: 10.1007/s10142-015-0470-z

Thakre, A., Gupta, M., Magar, S. P., Bahiram, K. B., Sardar, V. M., Korde, J. P., Bonde, S. W., Hyder, I. (2021). Transcriptional and translational abundance of visfatin (NAMPT) in buffalo ovary during estrous cycle and its in vitro effect on steroidogenesis. *Domestic Animal Endocrinology*, *75*, 106583. DOI: 10.1016/j.domaniend.2020.106583

Van den Bergh, R., Morin, S., Sass, H. J., Grzesiek, S., Vekemans, M., Florence, E., Thanh Thi Tran, H., Imiru, R. G., Heyndrickx, L., Vanham, G., De Baetselier, P., Raes, G. (2012). Monocytes Contribute to Differential Immune Pressure on R5 versus X4 HIV through the Adipocytokine Visfatin/NAMPT. *PLoS ONE*, *7*(4), e35074. DOI: 10.1371/journal.pone.0035074

Wang, Y.-Y., Hung, A. C., Lo, S., Yuan, S.-S. F. (2021). Adipocytokines visfatin and resistin in breast cancer: Clinical relevance, biological mechanisms, and therapeutic potential. *Cancer Letters*, *498*, 229–239. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.10.045

7. SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka starterów użytych w badaniach

Tabela 2. Specyfikacja przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych stosowanych podczas analizy Western Blot

Tabela 3. Specyfikacja przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych stosowanych podczas immunofluorescencji

Tabela 4. Specyfikacja przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych stosowanych podczas analizy Western Blot