

Dominika Gutkowska-Kawka

**Wpływ diety matki podczas laktacji na funkcjonowanie osi
podwzgórze-przysadka-gonady u potomstwa płci żeńskiej
w ujęciu wielopokoleniowym**

Praca doktorska
wykonana w InLife Instytucie Rozrodu
Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

PROMOTOR:
Prof. dr hab. Monika M. Kaczmarek

Olsztyn, styczeń 2026

**Badania przedstawione w niniejszej pracy zostały wykonane
i sfinansowane w ramach projektu NCN OPUS 2018/31/B/NZ4/03527
oraz instytutowego projektu Funduszu Badań Własnych - FBW/2025/ZPPiR**



Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować mojej Promotorce, prof. dr hab. Monice M. Kaczmarek, za nieocenione wsparcie merytoryczne i organizacyjne na każdym etapie realizacji badań oraz przygotowywania niniejszej pracy. Dziękuję za zaufanie, cenne wskazówki i inspirację, a także za wprowadzenie mnie w świat pracy naukowej, stworzenie przestrzeni do samodzielności i możliwość uczenia się na błędach. Dzięki temu mogłam rozwinąć warsztat badawczy, nabrać pokory i dojrzeć zarówno jako naukowiec, jak i człowiek.

Składam również podziękowania pracownikom byłego Zakładu Mechanizmów Działania Hormonów oraz Laboratorium Analizy Komórek, a w szczególności Pani Kasi Gromadzkiej-Hliwie, Panu Jankowi Kłowskiemu oraz dr. Krzysztofowi Witkowi za życzliwość, przekazaną wiedzę, fachową pomoc i wsparcie w rozwiązywaniu codziennych problemów badawczych, a także za każde dobre słowo, żart i uśmiech.

Dziękuję także Marcie Romaniewicz, Gosi Sikorze, dr. Tomaszowi Molcanowi oraz dr. Kamilowi Myszczyńskiemu z Laboratorium Biologii Molekularnej za wsparcie merytoryczne i pomoc w realizacji eksperymentów, a także za każdą wartościową rozmowę oraz cierpliwe odpowiedzi na wszystkie pytania.

Szczególne podziękowania składam dr Marii M. Guzewskiej — koleżance z zespołu, a prywatnie bliskiej przyjaciółce — za nieustanną gotowość do pomocy, wspólne konsultacje, dzielenie się doświadczeniem oraz wsparcie i otuchę w trudniejszych momentach.

Serdeczne podziękowania składam prof. Annie Ajduk z Zakładu Embriologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, a także pracownikom byłej Grupy Neurobiologii Naprawczej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN – prof. Małgorzacie Skup oraz dr Annie Głowackiej – oraz zespołowi prof. Susanne E. Ulbrich z ETH Zürich za istotny wkład w uzyskane wyniki, pomoc w przeprowadzeniu eksperymentów oraz wsparcie w realizacji wymagających analiz.

Dr. Laurentowi Kappelerowi oraz Maud Clemessy, pracownikom Laboratorium UMR-S 1166 (ICAN) w Paryżu, dziękuję za życzliwe przyjęcie podczas stażu naukowego oraz przekazanie mi niezbędnej wiedzy i praktycznych umiejętności z zakresu hodowli fragmentów podwzgórza.

Z całego serca dziękuję również rodzinie i przyjaciołom, przede wszystkim mojemu mężowi i mamie, za cierpliwość, wyrozumiałość, dobre słowo i wiarę w moje możliwości, często większą niż moja własna.

Niniejszą pracę dedykuję mojej córce Emilce, która towarzyszyła mi w końcowym etapie badań i pisania pracy, a jednocześnie stała się moją największą motywacją do jej ukończenia.

Spis treści

Streszczenie	7
Abstract	9
Alfabetyczny wykaz najczęściej stosowanych skrótów	11
1. Wstęp.....	13
1.1. Programowanie żywieniowe.....	13
1.1.1. Podstawy koncepcji programowania żywieniowego	13
1.1.2. Żywnienie matki a zdrowie potomstwa	13
1.1.3. Programowanie żywieniowe funkcji rozrodczych	14
1.1.4. Rola leptyny w programowaniu żywieniowym i dojrzewaniu płciowym.....	15
1.2. Programowanie żywieniowe na przestrzeni pokoleń	16
1.2.1. Modyfikacje epigenetyczne.....	17
1.2.2. Międzypokoleniowe i transgeneracyjne skutki oddziaływań środowiskowych.	18
1.2.3. Dziedziczenie międzypokoleniowe i transgeneracyjne w kontekście badań na ludziach i modelach zwierzęcych	20
1.2.4. Środowisko prenatalne jako czynnik kształtujący zdrowie przyszłych pokoleń	21
1.3. Oś podwzgórze-przysadka-gonady i kontrola jej funkcjonowania	22
1.3.1. Neuroendokrynną regulacją osi podwzgórze-przysadka-gonady.....	22
1.3.2. Rola kisspeptyny w regulacji dojrzewania płciowego i funkcji rozrodczych	23
1.3.3. Folikulogeneza	27
1.3.4. Steroidogeneza w jajniku	31
1.3.5. Komórka jajowa	32
2. Cel pracy	36
3. Materiały i metody	37
3.1. Podstawowe związki chemiczne, roztwory, zestawy odczynników, materiały i aparatura.....	37
3.2. Warunki utrzymania zwierząt i opis modelu doświadczalnego	42
3.2.1. Warunki hodowlane	42
3.2.2. Zwierzęta typu dzikiego	43
3.2.3. Zwierzęta transgeniczne	43
3.2.4. Protokół żywieniowy i kojarzenie myszy	44
3.3. Obserwacje przyżyciowe	46
3.3.1. Ocena masy i składu ciała	46
3.3.2. Ocena dojrzałości płciowej oraz cyklu rujowego.....	46
3.3.3. Ocena potencjału rozrodczego samic	47

3.4.	Pobieranie i przygotowanie tkanek do dalszych analiz	47
3.4.1.	Pobieranie krwi	47
3.4.2.	Pobieranie narządów przeznaczonych do izolacji kwasów nukleinowych	47
3.4.3.	Pobieranie narządów przeznaczonych do analiz immunohistochemicznych.....	47
3.4.4.	Krojenie tkanek	48
3.4.5.	Perfuzja.....	48
3.4.6.	Przygotowanie i przechowywanie skrawków mózgowych.....	48
3.5.	Oznaczenie stężenia hormonów	48
3.6.	Metody pracy z kwasami nukleinowymi.....	49
3.6.1.	Izolacja DNA.....	49
3.6.2.	Izolacja RNA.....	50
3.6.3.	Badanie ekspresji genów	50
3.6.4.	Sekwencjonowanie RNA	52
3.6.5.	Ustalenie genotypu zwierząt transgenicznych	53
3.7.	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>	57
3.7.1.	Procedura hybrydyzacji <i>in situ</i>	57
3.7.2.	Obrazowanie i analiza obrazu	59
3.8.	Barwienia immunohistochemiczne i fluorescencyjne	59
3.8.1.	Jajniki	59
3.8.2.	Tkanka mózgowa	60
3.8.3.	Fragmenty jądra łukowego	62
3.9.	Ocena statusu metabolicznego oocytów	65
3.9.1.	Stymulacja hormonalna samic	65
3.9.2.	Izolacja komórek jajowych	65
3.9.3.	Izolacja DNA z pojedynczego oocytu.....	65
3.9.4.	Oznaczanie liczby kopii mtDNA w pojedynczym oocyte.....	65
3.9.5.	Oznaczenie poziomu ATP.....	66
3.9.6.	Ocena potencjału redoks	67
3.9.7.	Ocena potencjału błony mitochondrialnej, stresu oksydacyjnego oraz zawartości lipidów.....	67
3.10.	Analiza statystyczna.....	68
4.	Wyniki.....	70
4.1.	Skutki niedożywienia matki w okresie laktacji – analiza fenotypu samic w kolejnych pokoleniach	70
4.1.1.	Masa i skład ciała	70
4.1.2.	Dojrzewanie płciowe.....	74

4.1.3	Potencjał rozrodczy	77
4.1.4	Profil hormonalny	79
4.1.5	Liczba pęcherzyków jajnikowych i odpowiedź na stymulację hormonalną	82
4.2	Wpływ niedoborów żywieniowych we wczesnym okresie życia na transkryptom jajnika w ujęciu wielopokoleniowym	85
4.3	Profil metaboliczny oocytów samic pokolenia F1 i F2	98
4.4	Skutki niedożywienia matki w czasie laktacji – zmiany na poziomie podwzgórza	110
4.4.1	Przestrzenny wzór ekspresji genów w podwzgórzu – hybrydyzacja <i>in situ</i>	110
4.4.2	Przestrzenny rozkład neuronów kisspeptynowych i ER α	114
4.4.3	Charakterystyka neuronów KNDy	120
4.4.4	Ekspresja <i>Lepr</i> w jądrze łukowatym podwzgórza i funkcjonalna odpowiedź neuronalna na leptynę.....	122
5.	Dyskusja	126
5.1.	Niedożywienie matki w czasie laktacji skutkuje zmianami składu ciała u potomstwa	127
5.2.	Niedożywienie matki w czasie laktacji wpływa negatywnie na dojrzewanie płciowe i sukces rozrodczy potomstwa.....	128
5.3.	Wczesny stres żywieniowy opóźnia dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych i wpływa na produkcję hormonów	130
5.4.	Wczesny stres żywieniowy prowadzi do metabolicznego przeprogramowania jajników	132
5.5.	Matczyne niedożywienie w okresie laktacji zmienia profil bioenergetyczny oocytów potomstwa	133
5.6.	Wczesny stres żywieniowy zmienia przestrzenny rozkład ekspresji transkryptów i białek w podwzgórzu	135
5.7.	Wczesny stres żywieniowy zaburza leptynozależną stymulację rozwoju projekcji neuronów ARC.....	137
5.8.	Potencjalne mechanizmy programowania osi HPG przez wczesny stres żywieniowy	138
5.9.	Ograniczenia metodologiczne pracy i dalsze kierunki badań	140
6.	Podsumowanie i wnioski.....	142
7.	Bibliografia.....	144
8.	Wykaz publikacji autorki rozprawy	166

Streszczenie

Na wczesnych etapach rozwoju, obejmujących życie płodowe oraz wczesny okres po urodzeniu (postnatalny), organizm jest szczególnie wrażliwy na bodźce środowiskowe, przy dominującym wpływie środowiska matczynego. Zarówno niedobór, jak i nadmiar składników odżywczych w tym czasie mogą determinować trajektorię rozwoju potomstwa, a w niektórych przypadkach oddziaływać wielopokoleniowo. U myszy w okresie postnatalnym intensywnie dojrzewa oś podwzgórze-przysadka-gonady (HPG, ang. *hypothalamus-pituitary-gonadal axis*), której aktywność u samic współregulują dwie główne populacje neuronów kisspeptynowych zlokalizowane w jądrze przednio-brzuszo-okołokomorowym/jądrze okołokomorowym (AVPV/PeN, ang. *anteroventral periventricular nucleus/periventricular nucleus*) oraz jądrze łukowatym (ARC, ang. *arcuate nucleus*). Dojrzewanie obwodów neuronalnych w ARC – potencjalnie także tych uczestniczących w kontroli rozrodu – wspiera leptyna, kluczowy przekaźnik stanu metabolicznego organizmu.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu przejściowego stresu żywieniowego we wczesnym okresie życia, wynikającego z ograniczonej podaży energii, składników odżywczych i substancji bioaktywnych w mleku matek (pokolenie F0), na funkcjonowanie osi HPG u samic pokolenia F1. Dodatkowo oceniano, czy historia odżywiania matek wywiera długofalowy wpływ na kolejne pokolenie (F2), które nie było bezpośrednio narażone na niedożywienie.

W dniu porodu samice i ich mioty losowo przydzielono do dwóch grup: CON – samice kontrolne, żywione *ad libitum* podczas ciąży i laktacji; LUN (ang. *lactation undernutrition*) – samice otrzymujące w okresie laktacji 50% dziennej dawki karmy spożywanej przez samice kontrolne. Pokolenie F2 uzyskano z kojarzeń: CC (rodzice ♀CON x ♂CON), LC (♀LUN x ♂CON) oraz LL (♀LUN x ♂LUN) i karmiono *ad libitum*.

Badanie zaprojektowano z zamiarem prześledzenia głównych efektów matczynego niedożywienia podczas laktacji na funkcjonowanie osi HPG potomstwa. U samic F1 scharakteryzowano fenotyp (masę i skład ciała, przebieg dojrzewania płciowego, płodność, profil hormonalny i folikulogenezę) oraz zbadano następstwa molekularne i metaboliczne (RNA-seq jajników, ocena potencjału metabolicznego oocytów). Analogiczny zestaw analiz przeprowadzono u samic pokolenia F2 w celu identyfikacji cech, które utrwaliły się na przestrzeni pokoleń. Druga część pracy dotyczyła podwzgórzowej regulacji osi HPG u samic F1: oceniono układ kisspeptynowy (liczba neuronów w AVPV/PeN i ARC), sygnalizację estradiolową (*Esr1/ERα*), neurony KNDy i te z ekspresją receptora leptyny (*Lepr*) w ARC. Analiza objęła także ocenę wzrostu aksonów neuronów ARC w odpowiedzi na leptynę w okresie postnatalnego szczytu stężenia tego hormonu w osoczu.

Wykazano, że przejściowy stres żywieniowy we wczesnym okresie życia u samic LUN skutkował długotrwale obniżoną masą ciała i zawartością tkanki tłuszczowej, czemu początkowo towarzyszyło niższe stężenie leptyny w osoczu. Na poziomie endokrynnym stwierdzono także spadek stężenia androstendionu oraz wzrost stężenia LH w porównaniu do grupy CON. W jajnikach obserwowano zmniejszoną liczbę pęcherzyków drugorzędowych i antralnych, co współwystępowało z obniżeniem potencjału rozrodczego wraz z wiekiem. Analizy molekularne wskazały na przeprogramowanie metaboliczne jajników (zmiany w ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów i steroidogenezą) oraz oocytów

(zwiększony poziom lipidów, wyższy potencjał mitochondrialny i zmieniony status redoks). W podwzgórzu odnotowano obniżenie ekspresji *Kiss1* w AVPV/PeN, wzrost ekspresji *Lepr* w ARC oraz podwyższoną ekspresję ER α w AVPV/PeN w 21 dniu życia. Niedożywienie skutkowało także obniżeniem wrażliwości ogólnej populacji neuronów ARC na stymulację leptyną, przy zachowanej odpowiedzi neuronów kisspeptynowych.

W pokoleniu F2 najsilniejsze efekty dotyczyły grupy LL: w 21 dniu życia osobniki te charakteryzowały się niższą masą ciała i zawartością tkanki tłuszczowej oraz podwyższonym stężeniem estradiolu w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną (CC), a także obserwowano u nich późniejsze otwarcie dróg rodnych. Mimo że w dorosłości zmiany fenotypowe zanikły, utrzymywały się wybrane zmiany metaboliczne na poziomie oocytów (zwiększona zawartość lipidów, podwyższony potencjał mitochondrialny, zmieniony status redoks) oraz część różnic w ekspresji genów jajnika, analogicznych do tych obserwowanych między grupami LUN i CON.

Podsumowując, niedożywienie matek w okresie laktacji wywołuje rozległe i trwałe zmiany w osi rozrodczej ich córek – od regulacji podwzgórzowo-hormonalnej, przez funkcje jajników, po metabolizm pojedynczej komórki jajowej. Część tych zmian utrzymuje się w kolejnym pokoleniu F2, szczególnie w sytuacji, gdy oboje rodziców pochodziło z miotów narażonych na stres żywieniowy, co wskazuje na wielopokoleniowe utrwalanie jego skutków. Kluczową rolę może odgrywać przeprogramowanie gospodarki lipidowo-energetycznej oocytów, sprzyjające przekazywaniu efektów stresu żywieniowego kolejnym pokoleniom. Praca ta stanowi pierwsze tak kompleksowe ujęcie konsekwencji niedożywienia matek w okresie laktacji w krytycznym oknie programowania rozwojowego potomstwa oraz wyznacza nowe kierunki badań nad molekularnymi mechanizmami wielopokoleniowego programowania żywieniowego płodności samic.

Abstract

During early development, encompassing fetal life and the early postnatal period, the organism is particularly sensitive to environmental cues, with a dominant influence of the maternal environment. At this time, deviations in nutrient availability – both excess and deficiency – can shape the developmental trajectory of the offspring, in some instances, exert multigenerational effects that persist across generations. In mice, the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis undergoes rapid postnatal maturation; in females, its activity is co-regulated by two principal populations of hypothalamic kisspeptin neurons located in the anteroventral periventricular/periventricular nuclei (AVPV/PeN) and in the arcuate nucleus (ARC). The maturation of ARC neural circuitry – potentially including pathways involved in reproductive control – is supported by leptin, a key signal of the organism’s metabolic status.

The aim of this study was to evaluate the impact of transient nutritional stress during early postnatal life – resulting from reduced energy and nutrient supply as well as decreased levels of bioactive components in maternal milk (generation F0) – on HPG-axis function in female offspring (F1 generation). In addition, the study assessed whether maternal nutritional history exerts long-term effects on the subsequent generation (F2), which was not directly exposed to undernutrition.

On the day of parturition, dams and their litters were randomly assigned to one of two groups: CON – control dams fed *ad libitum* throughout pregnancy and lactation; and LUN (lactation undernutrition) – dams receiving 50% of the daily food intake consumed by controls during lactation. The F2 generation was generated using the following mating schemes: CC (♀CON × ♂CON), LC (♀LUN × ♂CON), and LL (♀LUN × ♂LUN) and fed *ad libitum*.

The study was designed to investigate the primary effects of maternal undernutrition during lactation on HPG function. In F1 females, the phenotype was characterized (body weight and composition, pubertal timing, fertility, hormonal profile, and folliculogenesis), and molecular and metabolic consequences were assessed (ovarian RNA-seq and oocyte metabolic potential). The same analytical framework was applied to F2 females to identify traits that persisted across generations. The second part of the work focused on hypothalamic regulation of the HPG axis in F1 females, including the kisspeptin system (numbers of kisspeptin neurons in AVPV/PeN and ARC), estradiol signaling (*Esr1/ERα*), KNDy neurons, and leptin receptor–expressing neurons (*Lepr*) within the ARC. ARC axonal outgrowth in response to leptin during the postnatal surge in circulating leptin was also evaluated.

The results demonstrated that transient nutritional stress in LUN females resulted in a long-lasting reduction in body weight and fat mass, initially accompanied by lower plasma leptin levels. At the endocrine level, circulating androstenedione levels were decreased and LH levels were increased compared with the CON group. In the ovaries, the number of secondary and antral follicles was reduced, which coincided with an age-related decline in reproductive potential. Molecular analyses indicated metabolic reprogramming of both the ovaries (altered expression of genes involved in lipid metabolism and steroidogenesis) and the oocytes (increased lipid levels, higher mitochondrial membrane potential, and altered redox status). In the hypothalamus, decreased *Kiss1* expression in the AVPV/PeN, increased *Lepr* expression in the ARC, and elevated *ERα* expression in AVPV/PeN were detected at postnatal day 21. Undernutrition also reduced leptin responsiveness in the overall ARC neuronal population, while preserving the leptin response of kisspeptin neurons.

In the F2 generation, the most pronounced effects were observed in the LL group. At postnatal day 21, LL females displayed reduced body weight and fat mass and increased plasma estradiol levels compared with controls (CC), and they also showed delayed vaginal opening.

Although overt phenotypic differences were no longer evident in adulthood, selected oocyte metabolic alterations persisted (increased lipid content, elevated mitochondrial potential, and altered redox status), together with a subset of ovarian gene-expression differences resembling those identified between LUN and CON.

In conclusion, maternal undernutrition during lactation induces broad and long-lasting alterations in the reproductive axis of female offspring – from hypothalamic regulation and hormonal balance to ovarian function and the metabolism of individual oocytes. Some of these changes persist in the F2 generation, specifically when both parents originate from undernourished litter, indicating multigenerational maintenance of nutritional stress effects. A key element of this process appears to be reprogramming of oocyte lipid-energy metabolism, which may facilitate transmission of undernutrition-related effects to the next generations. This work provides the first comprehensive characterization of the consequences of maternal undernutrition during lactation within the critical postnatal window of developmental programming in offspring and establishes new directions for research into the molecular mechanisms underlying multigenerational nutritional programming of female fertility.

Alfabetyczny wykaz najczęściej stosowanych skrótów

ARC (ang. *arcuate nucleus*) – jądro łukowate podwzgórza

AS-PCR (ang. *allele specific PCR*) – PCR specyficzny względem allelu

ATP (ang. *adenosine triphosphate*) – adenozyno-5'-trifosforan

AVPV/PeN (ang. *anteroventral periventricular nucleus/periventricular nucleus*) – jądro przednio-brzusze okołokomorowe/jądro okołokomorowe

BSA (ang. *bovine serum albumin*) – albumina surowicy bydlęcej

COCs (ang. *cumulus-oocyte complexes*) – kompleksy oocyt-wieniec promienisty

DAPI (ang. *4', 6-diamidino-2-phenylindole*) – 4',6-diamidyno-2-fenylindol

ddH₂O (ang. *double-distilled water*) – woda dwukrotnie destylowana

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

DNMT (ang. *DNA methyltransferase*) – metylotransferaza DNA

E2 – 17-β-estradiol

ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny

ERα (ang. *estrogen receptor alpha*) – receptor estrogenowy alfa

FAD (ang. *flavin adenine dinucleotide*) – utleniona forma dinukleotydu flawinoadeninowego

FSH (ang. *follicle stimulating hormone*) – hormon folikulotropowy

GnRH (ang. *gonadotropin-releasing hormone*) – gonadoliberyna

HPG (ang. *hypothalamus-pituitary-gonadal axis*) – oś podwzgórze-przysadka-gonady

IgG (ang. *immunoglobulin G*) – immunoglobulina G

KNDy (ang. *Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin neurons*) – neurony podwzgórza wykazujące współekspresję kisspeptyny, neurokininy B oraz dynorfiny A

LH (ang. *luteinizing hormone*) – hormon luteinizujący

MMP (ang. *mitochondrial membrane potential*) – potencjał błony mitochondrialnej

mRNA (ang. *messenger ribonucleic acid*) – matrycowy (informacyjny) RNA

mtDNA (ang. *mitochondrial DNA*) – mitochondrialny DNA

NAD(P)H (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

NDS (ang. *normal donkey serum*) – ośła surowica przedimmunizacyjna

NGS (ang. *normal goat serum*) – koźła surowica przedimmunizacyjna

ORR (ang. *optical redox ratio*) – optyczny wskaźnik redoks

PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami

POMC (ang. *proopiomelanocortin*) – proopiomelanokortyna

RCF (ang. *relative centrifugal force*) – względna siła odśrodkowa

RIA (ang. *radioimmuno assay*) – test radioimmunologiczny

RNA (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy

RNA-seq (ang. *RNA next generation sequencing*) – sekwencjonowanie nowej generacji RNA

ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

RPM (ang. *revolution per minute of rotor*) – prędkość obrotowa (obroty na minutę) rotora

RT (ang. *room temperature*) – temperatura pokojowa

RT-qPCR (ang. *real-time quantitative polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*) – białko ostrej regulacji steroidogenezy

TBS (ang. *Tris-buffered saline*) – roztwór soli fizjologicznej buforowany Trisem

TBST (ang. *Tris-buffered saline with Tween-20*) – roztwór soli fizjologicznej buforowany tris(hydroksymetylo)aminometanem z dodatkiem detergentu Tween-20

tdTomato (ang. *tandem dimer Tomato*) – tandemowe podwójne Tomato

VE (ang. *vaginal estrus*) – pierwsze wystąpienie rui (pierwszy *estrus*)

VO (ang. *vaginal opening*) – otwarcie ujścia pochwy, otwarcie dróg rodnych

1. Wstęp

1.1. Programowanie żywieniowe

1.1.1. Podstawy koncepcji programowania żywieniowego

Programowanie żywieniowe (inaczej metaboliczne) odnosi się do koncepcji zakładającej, że dieta i styl życia, oddziałujące w kluczowych okresach rozwoju, mogą trwale kształtować stan zdrowia jednostki. Szczególnie istotne okresy wrażliwości zostały zidentyfikowane w ciąży oraz w okresie postnatalnym, gdy organizm wykazuje najwyższą wrażliwość na wpływy zewnętrzne. Koncepcja programowania żywieniowego odgrywa istotną rolę w badaniach nad patogenezą chorób przewlekłych, takich jak cukrzyca, otyłość i choroby układu sercowo-naczyniowego oraz coraz częściej wykorzystywana jest do wyjaśnienia mechanizmów programowania funkcji innych układów.

Podstawą teorii programowania żywieniowego jest hipoteza "oszczędnego fenotypu" (ang. *thrifty phenotype hypothesis*), sformułowana przez Halesa i Barkera w 1992 roku (Hales i Barker, 1992). Zakłada ona, że niedobory żywieniowe w kluczowych momentach rozwoju w życiu płodowym wywołują trwałe adaptacje organizmu, które zwiększają ryzyko chorób metabolicznych w późniejszym życiu. Główne źródło tych niedoborów stanowi zazwyczaj niedostateczne odżywienie matki, choć mogą one także wynikać z czynników takich jak nieprawidłowe funkcjonowanie łożyska. Ograniczona dostępność składników odżywczych na wczesnych etapach życia skutkuje trwałymi zmianami w metabolizmie glukozy i insuliny, co może predysponować do wystąpienia cukrzycy typu 2 oraz zespołu metabolicznego w wieku dorosłym (Hales i in., 1991; Barker i in., 1993). Liczne badania potwierdziły początkowe doniesienia epidemiologiczne przedstawione przez Halesa i Barkera, choć stopień korelacji między niedoborami żywieniowymi a chorobami metabolicznymi wykazywał pewne różnice w poszczególnych badaniach (Hales i Barker, 2001).

Kluczową rolę w procesie programowania metabolicznego odgrywa organizm matki, który dostarcza niezbędnych składników odżywczych rozwijającemu się płodowi i noworodkowi, podczas karmienia piersią. Zarówno niedobór, jak i nadmierna podaż tych składników we wczesnym okresie życia mogą negatywnie wpływać na funkcjonowanie organizmu i zwiększać ryzyko rozwoju chorób przewlekłych (Gluckman i in., 2008). Nieprawidłowe żywienie matki w okresie prenatalnym i postnatalnym jej potomstwa może być również związane z zaburzeniami funkcji innych układów, w tym układu rozrodczego (Dupont i in., 2012).

Efekty programowania żywieniowego wykraczają poza pokolenie bezpośrednio doświadczające niedoboru lub nadmiaru składników odżywczych i mogą występować również w kolejnych pokoleniach, nawet jeśli nie były one bezpośrednio narażone na te same niekorzystne czynniki środowiskowe (Aiken i Ozanne, 2014). Efekty programowania na przestrzeni pokoleń często tłumaczy się mechanizmami epigenetycznymi (Jirtle i Skinner, 2007). Poza nimi istotne znaczenie mogą mieć również inne czynniki, takie jak interakcja rozwijającego się płodu ze środowiskiem macicy (Aiken i Ozanne, 2014).

1.1.2. Żywienie matki a zdrowie potomstwa

Wpływ nieoptymalnego odżywiania matki podczas ciąży na zdrowie jej potomstwa wykazano między innymi w badaniach nad populacjami dotkniętymi klęskami głodu, takimi jak

holenderska zima głodu w latach 1944-1945. Okazało się, że matki, które były narażone na istotne ograniczenie przyjmowanych kalorii podczas ciąży, wydały na świat dzieci, które miały podwyższone ryzyko otyłości, insulinooporności, cukrzycy typu 2 oraz chorób układu sercowo-naczyniowego (Roseboom i in., 2001). Dzieci matek niedożywionych w pierwszym trymestrze ciąży częściej były otyłe w wieku dorosłym (Ravelli i in., 1999). Niedobory pokarmowe na początku ciąży był także związane z niekorzystnym profilem lipidowym u potomstwa (Roseboom i in., 2000), podczas gdy ich występowanie w II i III trymestrze skutkowało głównie zaburzeniami metabolizmu glukozy (Ravelli i in., 1998) oraz problemami z układem oddechowym (Lopuhaä i in., 2000).

Dotychczas wykazano liczne niekorzystne powiązania między otyłością matki a zdrowiem jej potomstwa. Wyniki badań epidemiologicznych potwierdzają, że dzieci kobiet z nadmierną masą ciała lub cukrzycą ciążową mają podwyższone ryzyko nadwagi oraz otyłości już we wczesnym dzieciństwie (Pavlidou i in., 2023; Plagemann i in., 1997). W badaniach na modelach zwierzęcych stwierdzono, że stosowanie diety wysokotłuszczowej w ciąży może prowadzić u potomstwa do trwałych zmian w mechanizmach regulujących apetyt, co w konsekwencji sprzyja preferowaniu pokarmów o podwyższonej zawartości cukrów (Mezei i in., 2020).

Choć wiele badań skupia się na programowaniu żywieniowym w okresie prenatalnym, wczesne dzieciństwo, a zwłaszcza pierwsze 1000 dni życia, także stanowi okres wzmożonej wrażliwości, w którym dieta ma długofalowy wpływ na zdrowie (Zhou i in., 2023). Okres laktacji jest mniej zgłębnym obszarem badawczym niż okres życia prenatalnego. Niemniej jednak wyniki badań przeprowadzonych na gryzoniach wskazują, że ograniczenie spożycia pokarmu przez karmiące samice skutkuje obniżeniem masy ciała ich potomstwa po zakończeniu okresu karmienia, a efekty te utrzymują się również w dorosłości (Howie i in., 2012; Kaczmarek i in., 2016). Inne badania sugerują, że ograniczenie spożycia białka przez matki w czasie laktacji w dłuższej perspektywie wpływa na metabolizm potomstwa (Fagundes i in., 2007; Martins i in., 2018).

Z drugiej strony, przekarmianie niemowląt, zwłaszcza nadmierne spożycie mleka modyfikowanego, może przyczyniać się do przyspieszonego wzrostu masy ciała, co stanowi istotny czynnik ryzyka wystąpienia otyłości w późniejszych latach życia (Moschonis i in., 2023; Evelein i in., 2012). Wyniki badań epidemiologicznych wskazują także, że niemowlęta karmione mlekiem modyfikowanym mają wyższy wskaźnik masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) w porównaniu do dzieci karmionych piersią (Huang i in., 2018; Bell i in., 2017).

1.1.3. Programowanie żywieniowe funkcji rozrodczych

Odpowiednia masa ciała oraz właściwa ilość tkanki tłuszczowej odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu rozrodczego (Frisch i in., 1974). U osób z zaburzeniami odżywiania, takimi jak anoreksja, zbyt niska masa ciała prowadzi do zaburzeń hormonalnych, nieregularnych miesiączek, a w cięższych przypadkach do całkowitego zaniku menstruacji (Støving i in., 1999; Chen i in., 2023). W wielu sytuacjach przywrócenie odpowiedniego bilansu energetycznego skutkuje normalizacją cyklu menstruacyjnego (Frisch i in., 1974; Galusca i in., 2023). Podobne zaburzenia mogą występować również u kobiet z nadwagą i otyłością, u których nadmiar tkanki tłuszczowej wpływa negatywnie na regularność cykli. W takich przypadkach redukcja masy ciała często przyczynia się do ich unormowania (Silvestris i in., 2018; Rochester i in., 2009; Matsuzaki i in., 2017).

Doświadczenie stresu żywieniowego w życiu płodowym może wpływać na funkcjonowanie układu rozrodczego w dorosłości. Jednak badania u kobiet urodzonych podczas zimy głodu w Holandii nie wykazały istotnych zaburzeń w ich płodności ocenianej na podstawie liczby potomstwa i częstości poronień w porównaniu z grupą kontrolną (Lumey i Stein, 1997). W odróżnieniu od danych populacyjnych, badania na modelach zwierzęcych sugerują, że niedożywienie matki podczas ciąży może prowadzić do obniżonej płodności potomstwa. U myszy obserwowano mniejszą liczebność miotu w kolejnej ciąży (Meikle i Westberg, 2001), a u potomstwa żeńskiego stwierdzono zmniejszoną liczbę pęcherzyków jajnikowych i zaburzoną ekspresję genów związanych z ich funkcjonowaniem (Bernal i in., 2010).

Negatywny wpływ niedożywienia na układ rozrodczy może być również konsekwencją deficytu energetycznego we wczesnym dzieciństwie. U kobiet, które doświadczyły głodu przed pierwszą miesiączką częściej występowały nieregularne cykle miesiączkowe (Elias i in., 2007). Natomiast u kobiet narażonych na niedobory żywieniowe między 2. a 6. rokiem życia menopauza występowała wcześniej niż w populacji ogólnej (Elias i in., 2003). Wyniki badań przeprowadzonych na gryzoniach wykazały, że przewlekła restrykcja pokarmowa matki w okresie laktacji prowadzi do opóźnionego dojrzewania płciowego u potomstwa oraz zmian w ekspresji genów podwzgórza kontrolujących funkcje rozrodcze (Kaczmarek i in., 2016).

Dieta wysokotłuszczowa stosowana w okresie ciąży i laktacji może wywoływać również niekorzystne efekty u żeńskiego potomstwa. W badaniach przeprowadzonych na gryzoniach odnotowano przyspieszone dojrzewanie płciowe oraz nieregularne cykle rujowe w wieku dorosłym (Connor i in., 2012). Co więcej, podobnie jak w przypadku niedożywienia, dieta bogata w tłuszcze u matek prowadziła u ich córek do zaburzeń w rozmiarze i morfologii jajników oraz rozregulowania hormonalnego (Zhou i in., 2019; Lin i in., 2017).

1.1.4. Rola leptyny w programowaniu żywieniowym i dojrzewaniu płciowym

W kontekście programowania żywieniowego w okresie postnatalnym szczególną uwagę zwraca się na składniki mleka matki, które mogą wpływać na metabolizm i rozwój organizmu noworodka. Skład mleka może być modyfikowany przez dietę matki, choroby, których doświadcza oraz różne czynniki środowiskowe. Zmienia się on w trakcie laktacji w sposób dostosowany do zmieniających się potrzeb rosnącego niemowlęcia (Kunz i in. 1999). Leptyna, jeden z hormonów obecnych w mleku matki, uważana jest za istotny czynnik przyczyniający się do korzystnego wpływu karmienia piersią na zdrowie potomstwa (Palou i Pico, 2009).

Leptyna jest hormonem syntetyzowanym głównie przez tkankę tłuszczową, którego działanie w obrębie ośrodkowego układu nerwowego polega na oddziaływaniu z receptorami zlokalizowanymi w podwzgórzu, co prowadzi do hamowania odczuwania głodu oraz zwiększenia wydatku energetycznego (Ahima i Flier, 2000). Istnieje hipoteza, że leptyna obecna w mleku matki może być wchłaniana do krążenia ogólnoustrojowego noworodków i niemowląt za pośrednictwem receptorów leptynowych znajdujących się na komórkach nabłonkowych żołądka i jelita cienkiego (Casabiell i in., 1997; Aparicio i in., 2005; Chatmethakul i in., 2022). Mechanizm ten może odgrywać istotną rolę we wczesnej regulacji bilansu energetycznego oraz metabolizmu. Co więcej, wyniki badań naukowych wskazują, że podawanie fizjologicznych stężeń leptyny w okresie laktacji prowadzi do zahamowania pobierania pokarmu u młodych osobników, nie wpływając jednocześnie na ich masę ciała (Sanchez i in., 2005). Wyniki te sugerują, że leptyna dostarczana wraz z mlekiem matki może

uczestniczyć w krótkoterminowej regulacji pobierania pokarmu u noworodków oraz wywierać dodatkowe efekty biologiczne w okresie, gdy zarówno tkanka tłuszczowa, jak i układy kontrolujące apetyt pozostają jeszcze niedojrzałe (Sanchez i in., 2005).

Leptyna jest również istotnym czynnikiem zaangażowanym w programowanie funkcji metabolicznych. Wykazano, że jej podanie we wczesnym okresie postnatalnym może łagodzić, a nawet odwracać negatywne skutki niedożywienia doświadczonego w życiu płodowym, szczególnie u osobników żywionych w dorosłości dietą wysokotłuszczową (Vickers i in., 2005; Gluckman i in., 2007; Szostaczuk i in., 2017). Obserwacje te wskazują, że leptyna może pełnić funkcję czynnika ochronnego, wspomagając adaptację organizmu do zmieniających się warunków środowiskowych (żywieniowych) w ciągu życia.

Istotną rolę leptyny w zachowaniu płodności potwierdzają badania przeprowadzone na myszach *ob/ob*, pozbawionych genu kodującego ten hormon. Zwierzęta te cechują się znaczną otyłością, wynikającą głównie z nadmiernego spożycia pokarmu oraz obniżonego wydatku energetycznego (Coleman, 1978). Chociaż narządy rozrodcze tych zwierząt rozwijają się, pozostają one wyraźnie mniejsze, a zarówno samce, jak i samice zatrzymują się w rozwoju płciowym na etapie przedpokwitaniowym. U samic obserwuje się ponadto znaczne obniżenie poziomu hormonów płciowych (Batt i in., 1982; Chehab i in., 1996; Farooqi i in., 2002). Co istotne, restrykcja kaloryczna, mimo że prowadzi do redukcji masy ciała, nie przywraca funkcji rozrodczych u tych zwierząt. Dopiero suplementacja leptyną umożliwia inicjację dojrzewania płciowego oraz odzyskanie płodności (Mounzih i Chehab, 1997).

Podobne zależności obserwuje się u ludzi z mutacjami w genie kodującym leptynę. Osoby te rozwijają otyłość już na wczesnych etapach życia i nie przechodzą dojrzewania płciowego (Ozata i in., 1999). Podanie leptyny w dzieciństwie u tych osób nie prowadzi do przyspieszenia dojrzewania płciowego, co potwierdza wcześniejsze obserwacje wskazujące, że hormon ten nie jest bezpośrednim inicjatorem tego procesu, lecz pełni funkcję czynnika warunkującego jego przebieg (ang. *permissive effect*) – jest niezbędny do jego zajścia, jednak sam go nie wywołuje (Farooqi i in., 2002). Sugeruje to, że leptyna nie tylko reguluje dostępność energii, ale także pełni funkcję metabolicznego czynnika kontrolującego moment rozpoczęcia dojrzewania płciowego.

Na podstawie opisanych powyżej obserwacji można stwierdzić, że leptyna pełni funkcję swoistego łącznika między metabolizmem a funkcjami rozrodczymi, co czyni ją kluczowym elementem wczesnej regulacji fizjologicznej. Oznacza to, że zarówno jej stężenie, jak i funkcjonalność w początkowym okresie życia mogą mieć konsekwencje dla zdrowia reprodukcyjnego oraz metabolicznego.

1.2. Programowanie żywieniowe na przestrzeni pokoleń

Większość czynników środowiskowych nie wywołuje trwałych zmian w sekwencji DNA i nie prowadzi bezpośrednio do wystąpienia mutacji genetycznych (Jirtle i Skinner, 2007). Niemniej jednak, jak opisano wcześniej, czynniki te mogą istotnie wpływać na fenotyp organizmu oraz zwiększać ryzyko rozwoju różnych chorób, także w kolejnych pokoleniach. Kluczową rolę w przekazywaniu skutków oddziaływań środowiskowych pomiędzy pokoleniami odgrywa dziedziczenie epigenetyczne, a także ekspozycja na niedobór lub nadmiar czynników środowiskowych w szczególnie wrażliwych oknach programowania obejmujących komórki germinalne.

1.2.1. Modyfikacje epigenetyczne

Modyfikacje epigenetyczne obejmują procesy takie jak metylacja DNA, acetylacja i deacetylacja histonów, regulacja ekspresji genów z udziałem niekodujących RNA oraz remodelowanie chromatyny (Dupont i in., 2009). Pełnią one kluczową rolę w regulacji ekspresji genów, umożliwiając ich aktywację lub wyciszenie w zależności od kontekstu komórkowego oraz potrzeb organizmu.

1.2.1.1. Metylacja DNA

Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej, pochodzącej od donora S-adenozyl-L-metioniny, do atomu węgla C5 pierścienia cytozyny. Zachodzi najczęściej w obrębie dinukleotydów CpG, prowadząc do powstania 5-metylocytozyny (5mC; Holliday i Pough, 1975). Metylacja DNA zazwyczaj skutkuje wyciszeniem ekspresji genów, poprzez hamowanie wiązania czynników transkrypcyjnych z sekwencjami promotorowymi lub sprzyjanie rekrutacji białek odpowiedzialnych za kondensację chromatyny, co w konsekwencji uniemożliwia aktywność transkrypcyjną (Bird, 2002).

Metylotransferazy DNA (DNMT) są głównymi enzymami odpowiedzialnymi za katalizowanie procesu metylacji DNA. Do tej rodziny należą DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B oraz DNMT3L. Najlepiej poznanym i najpowszechniej występującym enzymem z tej grupy jest DNMT1, określana mianem metylotransferazy zachowawczej. Odpowiada ona za zachowanie wzorców metylacji DNA podczas podziału komórki. W trakcie replikacji DNMT1 rozpoznaje hemimetylowane DNA, w którym jedynie nić rodzicielska jest zmetylowana, i katalizuje przyłączenie grupy metylowej do nowo zsyntetyzowanej nici potomnej. Dzięki temu wzorce metylacji są wiernie przekazywane do komórek potomnych (Jeltsch, 2006). DNMT1 jest niezbędny dla zachowania pamięci epigenetycznej, szczególnie w komórkach somatycznych, gdzie stabilność profili ekspresji genów jest kluczowa dla utrzymania tożsamości i funkcji komórkowej (Bestor, 2000).

DNMT2, mimo klasyfikacji jako metylotransferaza DNA, metyluje głównie RNA (zwłaszcza tRNA), a jej rola w metylacji DNA pozostaje marginalna (Bestor, 2000).

DNMT3A i 3B odpowiadają za metylację zachodzącą *de novo*. Enzymy te ustanawiają nowe wzorce metylacji podczas wczesnego rozwoju embrionalnego, w trakcie różnicowania komórek oraz w odpowiedzi na bodźce środowiskowe (Goll i Bestor, 2005). W przeciwieństwie do DNMT1, DNMT3A i DNMT3B wprowadzają grupy metylowe do wcześniej niemetylowanych regionów DNA, kształtując epigenetyczny „krajobraz” genomu (Okano i in., 1999). DNMT3A pełni szczególnie istotną rolę w rozwoju komórek płciowych oraz we wczesnej embriogenezie, natomiast DNMT3B jest niezbędna dla prawidłowego ustalania wzorców metylacji DNA w okresie implantacji oraz podczas rozwoju narządów (Senner, 2011).

DNMT3L pełni funkcję regulatorową w procesie metylacji DNA. Choć nie wykazuje aktywności katalitycznej, wspomaga działanie metylotransferaz *de novo* poprzez zwiększenie ich powinowactwa do DNA oraz stymulowanie ich aktywności enzymatycznej. DNMT3L, mimo braku aktywności katalitycznej, jest kluczowa dla ustanawiania wzorców metylacji imprintów genomowych podczas gametogenezy (Bourc'his i in., 2001).

1.2.1.2. Modyfikacje histonów

Modyfikacje epigenetyczne histonów obejmują metylację, acetylację, fosforylację i ubikwitynację, z których każda jest katalizowana przez specyficzne enzymy, które dodają lub usuwają grupy chemiczne z białek histonowych. Acetylotransferazy histonowe (HAT) dodają grupy acetylowe do reszt lizynowych na histonach, co prowadzi do rozluźnienia chromatyny, a tym samym ułatwia aktywację transkrypcyjną (Kouzarides, 2007). Proces odwrotny przeprowadzany jest przez deacetylazy histonowe (HDAC), które usuwając grupy acetylowe, prowadzą do kondensacji chromatyny. Metylacja histonów, zachodząca głównie na resztach lizyny i argininy, jest mediowana przez metylotransferazy histonowe (HMT), które dodają grupy metylowe do konkretnych aminokwasów, wpływając na aktywność genów w zależności od kontekstu modyfikacji (Martin i Zhang, 2005). Na przykład, trimetylacja histonu H3 w pozycji lizyny 4 (H3K4me3) jest markerem aktywnych promotorów, natomiast trimetylacja tego samego histonu w pozycji lizyny 27 (H3K27me3) wiąże się z wyciszaniem genów (Ringrose i Paro, 2004). Dodatkowo, fosforylacja histonów, kontrolowana przez enzymy takie jak kinazy zależne od cyklin, odgrywa kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego oraz odpowiedzi na uszkodzenia DNA (Rossetto i in., 2012).

1.2.1.3. Niekodujące RNA

Niekodujące RNA odgrywają istotną rolę w regulacji epigenetycznej ekspresji genów. Szczególne znaczenie mają długie RNA niekodujące (lncRNA, ang. *long non-coding RNA*) które poprzez rekrutację kompleksów modyfikujących chromatynę wpływają na jej strukturę (Rinn i Chang, 2012), oraz mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*), regulujące ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym (Bartel, 2009). Niekodujące RNA mogą również modulować aktywność metylotransferaz DNA, kształtując wzorce metylacji DNA (Zhang i in., 2019).

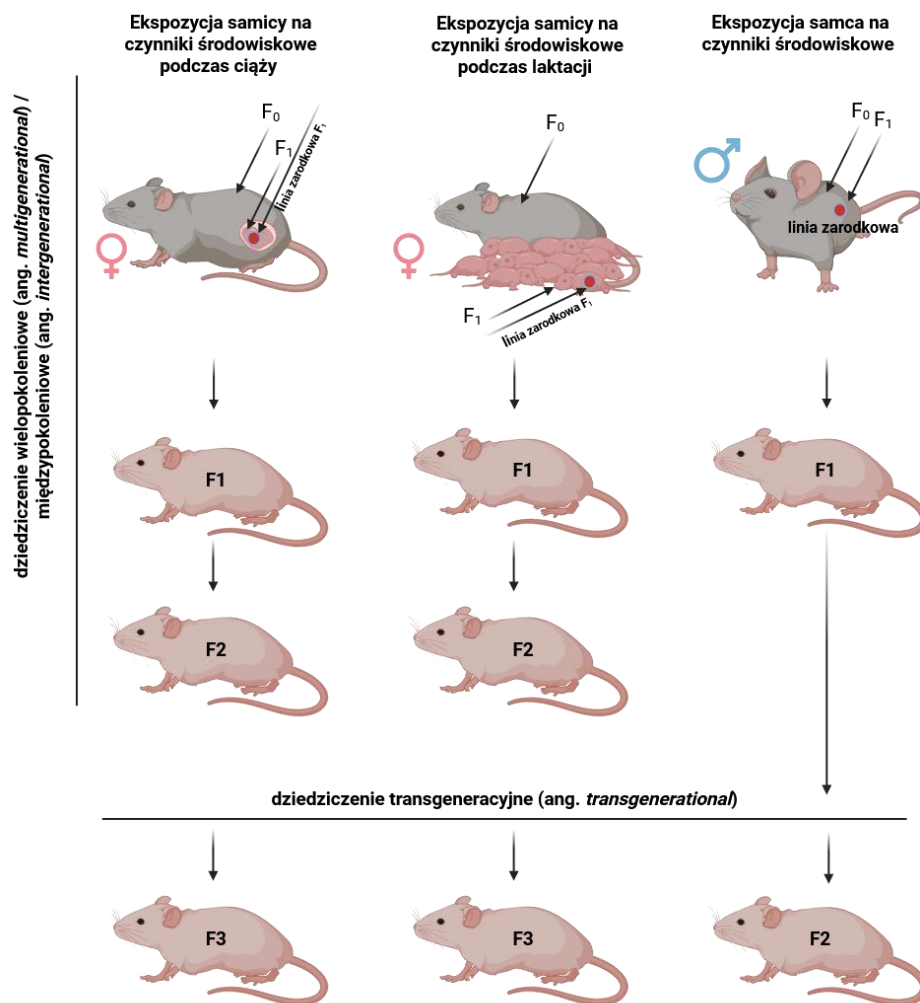
1.2.2. Międzypokoleniowe i transgeneracyjne skutki oddziaływań środowiskowych

Możliwość przekazywania skutków oddziaływań środowiskowych pomiędzy pokoleniami stanowi jeden z kluczowych problemów współczesnej biologii rozwoju i epigenetyki. W tym kontekście istotne jest rozróżnienie pomiędzy efektami wielopokoleniowymi (ang. *multigenerational*) a dziedziczeniem transgeneracyjnym (ang. *transgenerational*). Dziedziczenie wielopokoleniowe dotyczy sytuacji, w której zarówno organizm rodzicielski, jak i rozwijające się potomstwo (lub komórki, z których powstanie) są bezpośrednio narażone na działanie danego czynnika środowiskowego, co może prowadzić do zmian - najczęściej o charakterze epigenetycznym. Natomiast dziedziczenie transgeneracyjne polega na przekazaniu tych zmian dalej, poza pokolenia narażone bezpośrednio na czynnik programujący (Jirtle i Skinner, 2007).

W przypadku narażenia ciężarnej samicy (pokolenie F0) na określony czynnik środowiskowy, bezpośrednio ekspozycja są jednocześnie: organizm matki, rozwijający się płód (pokolenie F1) oraz komórki płciowe (linia germinalna), z których w przyszłości powstanie pokolenie F2 (Ryc. 1.1). Zmiany fenotypowe obserwowane w pokoleniu F1 i F2 w takim schemacie ekspozycji są zwykle klasyfikowane jako efekty wielopokoleniowe wynikające z bezpośredniego narażenia na czynnik programujący. Natomiast o dziedziczeniu transgeneracyjnym mówimy wtedy, gdy zmieniony fenotyp, wynikający z trwałego zapisu danego wzorca epigenetycznego, utrzymuje się w pokoleniu niepoddanym bezpośredniej ekspozycji – w przypadku narażenia ciężarnej samicy będzie to pokolenie F3 i kolejne (Skinner, 2008). Analogiczna sytuacja dotyczy ekspozycji na czynniki środowiskowe

we wczesnym okresie życia postnatalnego, np. podczas laktacji, w zależności od okna rozwoju komórek rozrodczych potomstwa.

Należy jednak podkreślić, że granica pomiędzy efektami wielopokoleniowymi a transgeneracyjnymi zależy od tego, czy na czynnik środowiskowy narażona była ciężarna/karmiąca samica, czy też samiec przed zapłodnieniem. W przypadku ekspozycji samca (pokolenie F₀) przed aktem kopulacji (zapłodnieniem), skutkującym postaniem kolejnego pokolenia (F₁), bezpośrednio narażone są jego plemniki (lub komórki prekursorowe spermatogenezy). W tym przypadku potomstwo F₁ może wykazywać skutki programowania wielopokoleniowego, które wynikają z ekspozycji gamety, a za pierwsze pokolenie o cechach odziedziczonych na drodze transgeneracyjnej często uznaje się pokolenie F₂.



Ryc. 1.1 Dziedziczenie wielopokoleniowe/międzypokoleniowe i transgeneracyjne. Dziedziczenie wielopokoleniowe (ang. *multigenerational*), nazywane też międzypokoleniowym (ang. *intergenerational*) odnosi się do efektów fenotypowych obserwowanych u potomstwa (F₁) w wyniku bezpośredniej ekspozycji organizmu rodzicielskiego (F₀), w tym także jego komórek rozrodczych, na określone czynniki środowiskowe. Skutki ekspozycji ciężarnej lub karmiącej samicy mogą obejmować również kolejne pokolenia, ponieważ niekorzystne warunki środowiskowe działające w organizmie matczynym (F₀) wpływają nie tylko na rozwój jej potomstwa (F₁), lecz także na komórki płciowe (linia germinalna), z których powstaje pokolenie F₂. Dziedziczenie transgeneracyjne dotyczy sytuacji, w której zmiany fenotypowe są przekazywane kolejnym pokoleniom mimo braku ich bezpośredniej ekspozycji na pierwotny czynnik środowiskowy; w zależności od płci osobnika z pokolenia F₀ pierwszym pokoleniem niewystawionym bezpośrednio na czynnik może być F₂ (ekspozycja samca) lub F₃ (ekspozycja ciężarnej bądź karmiącej samicy). Schemat przygotowano z wykorzystaniem narzędzia BioRender.com.

W 2010 roku Skinner podsumował swoje badania, formułując następującą definicję dziedziczenia transgeneracyjnego: „przekazywanie informacji epigenetycznej przez linię zarodkową (plemniki lub komórki jajowe) pomiędzy pokoleniami, niezależnie od bezpośredniej ekspozycji na czynniki środowiskowe lub ingerencje genetyczne” (Skinner i in., 2010). Definicja ta podkreśla kluczową rolę mechanizmów epigenetycznych w długoterminowym dziedziczeniu zmian fenotypowych, które mogą mieć istotne konsekwencje dla zdrowia oraz zdolności adaptacyjnych organizmów do zmieniających się warunków środowiskowych. Jednocześnie rozróżnienie pomiędzy dziedziczeniem wielopokoleniowym a transgeneracyjnym pozostaje istotnym wyzwaniem metodologicznym.

W przeciwieństwie do podejścia reprezentowanego przez Skinera, w części publikacji termin „dziedziczenie wielopokoleniowe” bywa stosowany zamiennie z określeniem „dziedziczenie międzypokoleniowe” (ang. *intergenerational*), co prowadzi do niejednoznaczności terminologicznej prac naukowych (Tuscher i Day, 2019; Mørkve Knudsen i in., 2018; Burton i Greer, 2022). Inni autorzy proponują szersze ujęcie dziedziczenia wielopokoleniowego, jako pojęcia obejmującego zarówno klasyczne dziedziczenie międzypokoleniowe, dotyczące pokoleń bezpośrednio narażonych na dany czynnik środowiskowy, jak i dziedziczenie transgeneracyjne, obserwowane u potomstwa pozbawionego bezpośredniego kontaktu z tym czynnikiem (Tuscher i Day, 2019). Takie podejście pozwala uniknąć konieczności jednoznacznego wykazania epigenetycznej transmisji niezależnej od ekspozycji środowiskowej, co w badaniach populacyjnych i eksperymentalnych często pozostaje trudne do jednoznacznego potwierdzenia. W odniesieniu do modelu badawczego zastosowanego w niniejszej pracy zdecydowano się na określenie „efekty wielopokoleniowe”, aby zachować zgodność z definicjami proponowanymi przez innych autorów.

1.2.3. Dziedziczenie międzypokoleniowe i transgeneracyjne w kontekście badań na ludziach i modelach zwierzęcych

Dziedziczenie zmian indukowanych przez czynniki środowiskowe zostało udokumentowane zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych, jak i w populacjach ludzi. Jednym z najbardziej znanych przykładów jest analiza konsekwencji omawianej już wcześniej zimy głodu w Holandii, obejmująca również pokolenie F2. Chociaż u potomstwa F2 nie zaobserwowano zwiększonej częstości chorób sercowo-naczyniowych ani zaburzeń metabolicznych, skutki stresu żywieniowego doświadczonego w życiu płodowym przez ich rodziców (pokolenie F1) manifestowały się u ich potomstwa między innymi w postaci zwiększonego otluszczenia organizmu w okresie noworodkowym oraz pogorszenia stanu zdrowia w późniejszym życiu (Painter i in., 2008).

Istotnym aspektem tych obserwacji jest zależność efektów od płci rodzica pokolenia F1. Wykazano, że jedynie potomstwo ojców, którzy w życiu płodowym doświadczyli niedoborów składników odżywczych, charakteryzowało się wyższą masą ciała oraz wskaźnikiem BMI w porównaniu z osobami nienarażonymi na tego rodzaju stres metaboliczny (Veenendaal i in., 2013).

Badania na modelach zwierzęcych umożliwiają bardziej szczegółowe analizy epigenomu oraz identyfikację mechanizmów leżących u podstaw dziedziczenia międzypokoleniowego i transgeneracyjnego. Wykazano, że ograniczenie podaży białka w diecie ciężarnych samic prowadzi do zmian w metylacji promotorów wybranych genów w wątrobie potomstwa F1, przy czym analogiczne zmiany obserwowano u pokolenia F2 (Burdge i in., 2007).

Również eksperymenty z udziałem zwierząt wskazują, że skutki oddziaływań środowiskowych w okresie prenatalnym manifestują się w zależności od płci rodzica wystawionego na niedożywienie. U potomstwa samców z pokolenia F1 obserwowano niższą masę urodzeniową, natomiast ekspozycja samic na niedożywienie *in utero* wiązała się ze zwiększonym ryzykiem otyłości w pokoleniu F2 (Jimenez-Chillaron i in., 2009). Natomiast, stosowanie diety wysokotłuszczowej u ciężarnych samic prowadziło do utrzymania się podwyższonej masy ciała aż do pokolenia F3, przy czym efekt ten był przekazywany wyłącznie przez linię ojcowską (Dunn i in., 2011).

Zrozumienie mechanizmów dziedziczenia międzypokoleniowego i transgeneracyjnego ma kluczowe znaczenie dla badań nad długofalowym wpływem czynników środowiskowych na zdrowie przyszłych pokoleń. Szczególną uwagę należy zwrócić na ich oddziaływanie na funkcjonowanie układu rozrodczego, ponieważ zmiany epigenetyczne mogą nie tylko determinować zdrowie jednostki, ale także wpływać na płodność i długoterminową stabilność populacji. W interpretacji takich efektów istotne jest odróżnienie transmisji przez linię zarodkową od powtarzającego się wpływu środowiska macicy w kolejnych ciążach, co omówiono w kolejnym podrozdziale.

1.2.4. Środowisko prenatalne jako czynnik kształtujący zdrowie przyszłych pokoleń

Przyjmuje się, że skutki programowania żywieniowego mogą być także przekazywane w linii matczynej *de novo* w kolejnych pokoleniach, jako konsekwencja rozwoju płodu w nieoptymalnym środowisku wewnątrzmacicznym, a nie wyłącznie na skutek bezpośrednio dziedziczonych modyfikacji epigenetycznych. Oznacza to, że niekorzystne warunki żywieniowe w jakich rozwijała się matka, mogą trwale kształtować jej fizjologię i metabolizm, a tym samym wpływać na środowisko macicy podczas kolejnej ciąży, które staje się czynnikiem programującym rozwój potomstwa.

Wśród czynników matczynych bezpośrednio wpływających na rozwój płodu można wymienić między innymi przepływ krwi w macicy, funkcjonowanie łożyska oraz ogólny stan metaboliczny matki. Niewystarczający przepływ krwi w macicy lub niewydolność łożyska mogą prowadzić do wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostu (IUGR, ang. *intrauterine growth retardation*), stanu, w którym płód nie otrzymuje wystarczającej ilości składników odżywczych i tlenu. IUGR wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób sercowo-naczyniowych oraz zaburzeń metabolicznych, takich jak cukrzyca typu 2, w późniejszym życiu (Barker, 1997; Malhotra i in., 2019).

Otyłość matczyzna została powiązana ze zmianami w transporcie składników odżywczych przez łożysko, co może prowadzić do nadmiernego wzrostu płodu (Gaccioli, 2013). Z kolei niedożywienie matki w czasie ciąży może skutkować zarówno ograniczonym, jak i nadmiernym wzrostem łożyska, w zależności od momentu wystąpienia oraz czasu trwania niedoboru składników odżywczych. Ponadto zaburzenia metaboliczne matki, takie jak stan przedrzucawkowy czy cukrzyca ciążowa, mogą istotnie zakłócać środowisko wewnątrzmaciczne, prowadząc do nieprawidłowej regulacji gospodarki glukozy i transportu składników odżywczych, co zwiększa ryzyko rozwoju otyłości i insulinooporności u potomstwa w dorosłości (Reichetzedler i in., 2016).

Interpretacja wyników badań nad dziedziczeniem wielopokoleniowym stanowi zatem istotne wyzwanie, ponieważ zmiany fenotypowe obserwowane w pokoleniu F2 mogą wynikać zarówno z dziedziczonych modyfikacji epigenetycznych, jak i z wpływu środowiska macicy

podczas ciąży (Lacal i Ventura, 2018). Zaburzona podaż składników odżywczych *in utero* lub zmieniony skład mleka matki w okresie laktacji mogą wpływać na metabolizm oraz masę ciała potomstwa, co w kolejnych ciążach może wtórnie modyfikować środowisko wewnątrzmaciczne, potencjalnie kształtując zdrowie następnych pokoleń.

1.3. Oś podwzgórze-przysadka-gonady i kontrola jej funkcjonowania

1.3.1. Neuroendokrynną regulacja osi podwzgórze-przysadka-gonady

Oś podwzgórze-przysadka-gonady (HPG, ang. *hypothalamus-pituitary-gonadal axis*) jest kluczowym układem neuroendokrynnym, który poprzez złożony system hormonalnych sprzężeń zwrotnych reguluje funkcje rozrodcze u ssaków. Oś ta rozpoczyna się w podwzgórzu, gdzie w okolicy przedwzrokowej zlokalizowane są neurony wydzielające hormon uwalniający gonadotropiny (GnRH, ang. *gonadotropin releasing hormone*). GnRH stymuluje przedni płat przysadki mózgowej do syntezy i wydzielania hormonu luteinizującego (LH, ang. *luteinizing hormone*) oraz hormonu folikulotropowego (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*), które działając na gonady, pobudzają gametogenezę oraz wytwarzanie hormonów steroidowych (Acevedo-Rodrigues i in., 2018).

Aktywność neuronów GnRH determinuje pulsacyjny wzorec wydzielania LH i FSH oraz warunkuje przedowulacyjny wzrost sekrecji gonadotropin u samic. Hormony steroidowe produkowane przez gonady, takie jak estrogeny (głównie 17- β -estradiol; E2), progesteron i testosteron, regulują funkcjonowanie podwzgórza i przysadki poprzez mechanizmy sprzężenia zwrotnego. Charakter regulacji osi HPG różni się w zależności od płci: u samców dominuje ujemne sprzężenie zwrotne, natomiast u samic występuje zarówno ujemne, jak i dodatnie sprzężenie zwrotne, związane z przebiegiem cyklu menstruacyjnego lub rujowego (Caraty i Franceschini, 2008).

Przez większość cyklu u samic, niskie i umiarkowane stężenia estrogenów wydzielanych przez jajniki wywierają negatywne sprzężenie zwrotne na uwalnianie GnRH, warunkując pulsacyjność jego wydzielania (Sarkar i Fink, 1980; Chongthammakun i Terasawa, 1993; Evans i in., 1994). Wraz ze wzrostem stężenia estrogenów podczas dojrzewania pęcherzyka jajnikowego dochodzi jednak do zmiany charakteru ich działania z hamującego na stymulujące. Skutkuje to aktywacją dodatniego sprzężenia zwrotnego, prowadzącego do gwałtownego wzrostu wydzielania GnRH (Sarkar i in., 1976; Moenter i in., 1990), a w konsekwencji wyrzutu LH z przysadki mózgowej, który inicjuje owulację (Freeman, 1994; Goodman i Inskeep, 2006).

Początkowo zakładano, że hormony steroidowe produkowane przez gonady oddziałują bezpośrednio na neurony GnRH. Późniejsze badania wykazały jednak, że neurony te nie wykazują ekspresji klasycznych receptorów hormonów steroidowych (Couse i in., 2003; Herbison, 2008). Sugerowano, że regulacja wydzielania GnRH przez hormony steroidowe odbywa się pośrednio, za pośrednictwem innych populacji neuronów wrażliwych na steroidy. Spośród wielu potencjalnych mediatorów kluczową rolę przypisano neuronom produkującym kisspeptynę, które uczestniczą zarówno w mechanizmach ujemnego, jak i dodatniego sprzężenia zwrotnego (Smith i in., 2005). Charakterystyczną cechą neuronów kisspeptynowych u samic jest powszechna ekspresja receptora estrogenowego alfa (ER α), który odgrywa ważną rolę w przekazywaniu sygnałów E2 w trakcie cyklu płciowego (Smith i in., 2005).

1.3.2. Rola kisspeptyny w regulacji dojrzewania płciowego i funkcji rozrodczych

Kisspeptyna, a właściwie grupa peptydów określanych jako kisspeptyny, jest produktem genu *KISS1* (*Kiss1* u gryzoni). Gen ten koduje rodzinę peptydów o zbliżonej strukturze, z których głównym produktem jest kisspeptyna-54 (znana również jako metastatyna), a także jej krótsze warianty, takie jak kisspeptyna-14, kisspeptyna-13 i kisspeptyna-10. Wszystkie te peptydy mają zdolność aktywacji receptora GPR54, znanego również jako KISS1R (*Kiss1r* u gryzoni; Oakley i in., 2009; Pinilla i in., 2012; Roa i in., 2008).

U ludzi mutacje w genie kodującym receptor kisspeptyny prowadzą do hipogonadyzmu hipogonadotropowego, który objawia się niedostatecznym rozwojem gonad, brakiem drugorzędowych cech płciowych oraz niskimi stężeniami hormonów płciowych (Seminaro i in., 2003). Zbliżone fenotypy obserwowano w badaniach na modelach mysich, w których mutacje w genie kodującym kisspeptynę lub jej receptor skutkowały brakiem dojrzewania płciowego, niepłodnością oraz obniżonym poziomem hormonów płciowych (Colledge, 2009).

Fundamentalna rola kisspeptyny w prawidłowym funkcjonowaniu osi HPG wynika z jej kluczowego zaangażowania w regulację wydzielania GnRH oraz gonadotropin. Badania eksperymentalne wykazały, że podanie egzogennej kisspeptyny gryzoniom, a także innym gatunkom, w tym ludziom, prowadzi do wzrostu stężenia LH i FSH w krążeniu (Oakley i in., 2009; Kauffman, 2010). Dalsze badania potwierdziły, że kisspeptyna syntetyzowana w podwzgórzu bezpośrednio aktywuje neurony GnRH poprzez receptor kisspeptynowy, inicjując i podtrzymując aktywność osi rozrodczej (Oakley i in., 2009; Kauffman, 2010).

W okresie dojrzewania płciowego podwzgórzowy układ kisspeptynowy, rozumiany jako system sygnalizacji kisspeptyna-KISS1R/GPR54 sterujący wydzielaniem GnRH w podwzgórzu, ulega intensywnej i złożonej aktywacji, niezbędnej dla prawidłowego przebiegu pokwitania. Badania prowadzone na gryzoniach wykazały, że dojrzewanie płciowe wiąże się ze wzrostem wrażliwości na stymulujące działanie kisspeptyny w zakresie odpowiedzi GnRH/LH (Castellano i in., 2006; Han i in., 2005). Równocześnie obserwuje się znaczący wzrost ekspresji genu *Kiss1* w podwzgórzu u szczurów i małp w tym okresie, co wskazuje na nasilenie sygnalizacji kisspeptynowej (Navarro i in., 2004; Shahab i in., 2005). Szczegółowe analizy neuroanatomiczne u samic myszy ujawniły także gwałtowny wzrost liczby neuronów kisspeptynowych w czasie dojrzewania płciowego, a także zwiększenie liczby projekcji i kontaktów synaptycznych tych neuronów z neuronami GnRH (Clarkson i in., 2010).

1.3.2.1. Populacje neuronów kisspeptynowych w podwzgórzu

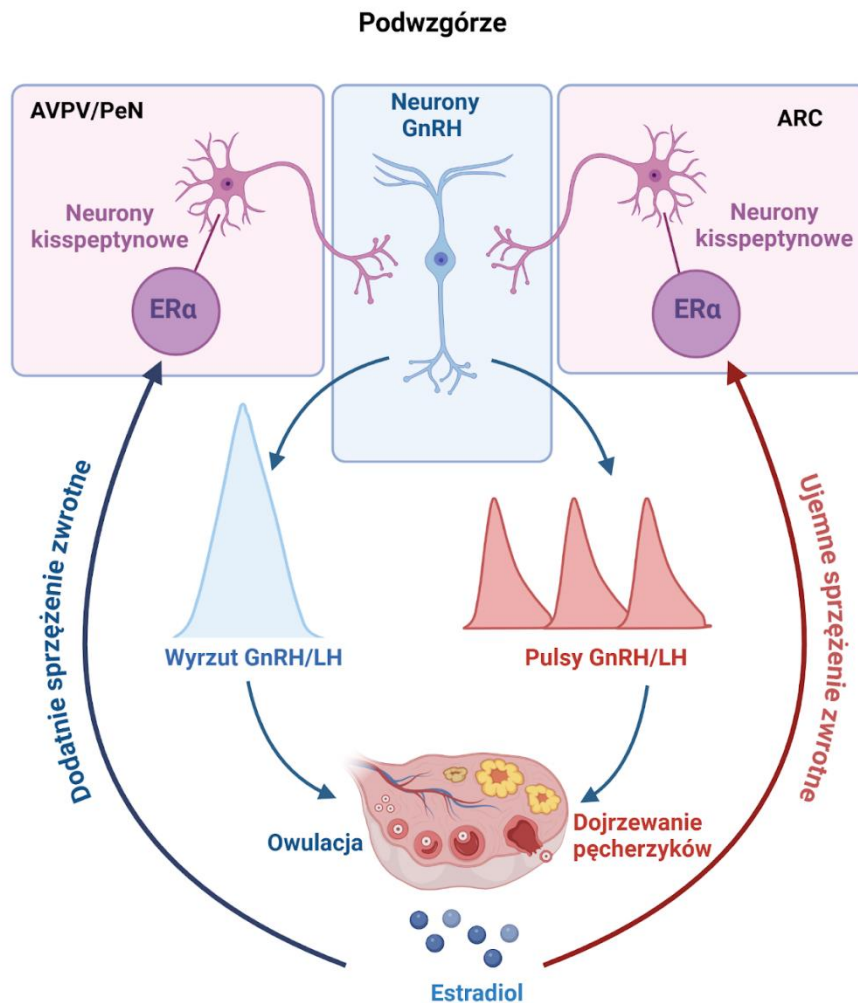
U wielu gatunków ssaków, w tym gryzoni, owiec i naczelnych, ekspresję kisspeptyny wykazano głównie w dwóch odrębnych regionach podwzgórza: w okolicy przedwzrostkowej (POA, ang. *preoptic area*) – która u gryzoni obejmuje jądro przednio-brzusze okołokomorowe oraz sąsiadujące jądro okołokomorowe (AVPV/PeN, ang. *anteroventral periventricular nucleus/periventricular nucleus*), a także w jądrze łukowatym (ARC, ang. *arcuate nucleus*; Herbison, 2008; Lehman i in., 2013).

Jak wcześniej wspomniano, neurony kisspeptynowe w podwzgórzu odgrywają nadrzędną rolę w przekazywaniu sygnałów hormonów płciowych do neuronów GnRH. Schemat na rycinie 1.2 przedstawia regulację sygnału kisspeptynowego w ARC oraz AVPV/PeN przez estrogeny, opartą o sprzężenia zwrotne. W ARC, które odpowiada za pulsacyjne wydzielanie GnRH,

ekspresja *Kiss1* jest hamowana przez estrogeny w ramach ujemnego sprzężenia zwrotnego, co umożliwia precyzyjną kontrolę częstotliwości pulsów GnRH oraz LH (Oakley i in., 2009; Kauffman, 2010). Z kolei neurony kisspeptynowe w rejonie AVPV/PeN pośredniczą w dodatnim sprzężeniu zwrotnym estrogenów, inicjując przedowulacyjny wyrzut GnRH i LH (Khan i Kauffman, 2012). Wykazano, że ekspresja genu *Kiss1* w tym obszarze jest wyższa u samic niż u samców, u których nie obserwuje się przedowulacyjnego wzrostu stężenia LH. Ponadto neurony kisspeptynowe w rejonie AVPV/PeN charakteryzują się zwiększoną aktywnością neuronalną w okresie poprzedzającym wyrzut LH (Robertson i in., 2009). Znaczenie kisspeptyny w regulacji owulacji potwierdzają także badania na myszach z nokautem genu *Kiss1* lub genu kodującego receptor kisspeptyny (*Gpr54*), u których wyrzut LH nie występuje nawet po podaniu E2 (Clarkson i in., 2008; Dror i in., 2013).

Poziom ekspresji genu *Kiss1* w ARC u samic gryzoni jest wykrywany już w okresie prenatalnym i początkowo utrzymuje się na poziomie zbliżonym do obserwowanego u dorosłych osobników. Przed okresem dojrzewania (około 3 tydzień życia) ekspresja ta ulega przejściowemu obniżeniu, by następnie ponownie wzrosnąć w trakcie dojrzewania płciowego (Takumi i in., 2011; Semaan i Kauffman, 2022).

W rejonie AVPV/PeN pierwsze neurony kisspeptynowe u myszy i szczurów pojawiają się pod koniec drugiego tygodnia życia postnatalnego (około 10-15 dnia po urodzeniu), jednak ich liczba początkowo pozostaje bardzo niska (Cao i in., 2012; Semaan i in., 2010). Istotny wzrost liczebności populacji neuronów kisspeptynowych w omawianym obszarze podwzgórza następuje w czwartym tygodniu życia, osiągając najwyższe wartości w okresie bezpośrednio poprzedzającym dojrzewanie płciowe (Semaan i Kauffman, 2015; Clarkson i Herbison, 2006).



Ryc. 1.2 Ujemne i dodatnie sprzężenia zwrotne estrogenów w ARC oraz AVPV/PeN samic gryzoni z udziałem neuronów kisspeptynowych. Neurony ARC wykazujące ekspresję ER α , pośredniczą w hamowaniu przez estradiol wydzielania hormonu GnRH w podwzgórzu oraz LH z przysadki mózgowej w ramach ujemnego sprzężenia zwrotnego. Wraz z dojrzewaniem pęcherzyków jajnikowych podczas cyklu rujowego poziom estradiolu w krążeniu znacząco wzrasta i działając poprzez neurony kisspeptynowe zlokalizowane w obrębie jądra przednio-brzusznego okołokomorowego oraz sąsiadującego jądra okołokomorowego (AVPV/PeN), inicjuje przedowulacyjny wyrzut GnRH i LH w ramach dodatniego sprzężenia zwrotnego. Schemat przygotowany z wykorzystaniem narzędzia BioRender.com.

W trakcie cyklu rujowego, E2 nie tylko reguluje aktywność opisanych powyżej populacji neuronów kisspeptynowych lecz także odgrywa kluczową rolę w ich rozwoju przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. Usunięcie gonad u samic około 15 dnia życia prowadzi do spadku ekspresji kisspeptyny w regionie AVPV/PeN o 70–90%, zarówno w okresie dojrzewania, jak i u dorosłych osobników (Clarkson i in., 2009, 2012). Efekt ten ulega odwróceniu po podaniu niskich dawek E2 (Clarkson i in., 2009). Zasadniczą rolę E2 w rozwoju neuronów kisspeptynowych w rejonie AVPV/PeN potwierdzają również badania wykonane na myszach pozbawionych enzymu aromatazy cytochromu P450, katalizującego konwersję testosteronu do estradiolu – u tych zwierząt obserwowano nieliczne neurony kisspeptynowe w AVPV/PeN lub ich całkowity brak (Clarkson i in., 2009).

Usunięcie jajników samicom myszy na wczesnym etapie życia prowadzi do wzrostu ekspresji genu *Kiss1* w ARC, co stanowi efekt przeciwny do obserwowanego w regionie AVPV/PeN

(Kauffman i in., 2009). Analogiczne zależności opisano u owiec, u których po usunięciu jajników liczba neuronów kisspeptynowych w ARC była wyższa niż u osobników kontrolnych – bez ovariectomii (Nestor i in., 2012). Dane te wskazują, że przed okresem dojrzewania E2 hamuje ekspresję kisspeptyny w ARC, a osłabienie ujemnego sprzężenia zwrotnego może odpowiadać za wzrost ekspresji *Kiss1* w trakcie dojrzewania płciowego.

1.3.2.2. Neurony KNDy w kontroli pulsacyjnego wydzielania GnRH

Neurony KNDy (ang. *Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin neurons*) stanowią wyspecjalizowaną populację komórek nerwowych zlokalizowaną w ARC, która oprócz kisspeptyny wykazuje także ekspresję dwóch innych neuropeptydów: neurokininy B oraz dynorfiny A. Neurokinina B kodowana jest przez gen *Tac2* u gryzoni oraz *TAC3* u człowieka, natomiast dynorfina A przez odpowiednio gen *Pdyn* oraz *PDYN* (Burke i in., 2006; Navarro i in., 2012; Goodman i in., 2004).

Neurony KNDy odgrywają kluczową rolę w generowaniu i regulacji pulsacyjnego wydzielania GnRH oraz gonadotropin. Przeciwwstawne działanie neurokininy B i dynorfiny A pozwala na precyzyjną regulację aktywności neuronów KNDy, co umożliwia utrzymanie rytmicznego charakteru sygnalizacji osi HPG (Goodman i in., 2007). Neurokinina B inicjuje i/lub wzmacnia zsynchronizowaną aktywność neuronów KNDy poprzez aktywację pobudzających receptorów NK3R. W efekcie dochodzi do uwalniania kisspeptyny, która oddziałuje następnie na receptory GPR54 zlokalizowane na neuronach GnRH, stymulując ich aktywność. Z kolei dynorfina A wiąże się hamującymi receptorami κ -opiodowymi, obniżając aktywność neuronów KNDy i wygaszając pulsacyjne wydzielanie GnRH (Uenoyama i in., 2021).

Neurony KNDy wykazują ekspresję receptorów wrażliwych na sygnały metaboliczne (Backholler i in., 2010; Cernea i in., 2016), podobnie jak neurony tworzące z nimi połączenia synaptyczne (Elias i in., 1999; Cernea i in., 2016). Dzięki temu stanowią one ważny element integrujący sygnały związane ze stanem energetycznym organizmu z regulacją osi rozrodczej, pośrednicząc w dostosowaniu wydzielania kisspeptyny i GnRH do dostępności zasobów energetycznych.

W badaniach wykorzystujących restrykcję pokarmową jako model stresu metabolicznego wykazano, że deficyt energetyczny nie tylko obniża ekspresję *Kiss1* w ARC, lecz także tłumi podwzgórzową ekspresję genów kodujących neurokininę B oraz jej receptor u dojrzewających samic szczurów (Navarro i in., 2012). Co istotne, opóźnienie dojrzewania płciowego u samic wywołane niedożywieniem w okresie młodzieńczym zostało częściowo złagodzone poprzez wielokrotne podawanie agonisty receptora NK3R, co potwierdza funkcjonalne znaczenie sygnalizacji neurokininy B w tym procesie (Navarro i in., 2012). Efekt ten był porównywalny z odpowiedzią uzyskaną po iniekcji kisspeptyny-10 u dojrzewających samic szczurów poddanych podobnemu stopniowi niedożywienia (Castellano i in., 2005). Z kolei u dojrzewających samic szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową obserwowano zwiększoną ekspresję *Kiss1* oraz *Tac2* w ARC, a także wzrost częstotliwości pulsów LH (Li i in., 2012), co dodatkowo potwierdza udział neuronów KNDy w powiązaniu stanu metabolicznego (energetycznego) z regulacją funkcji rozrodczych.

1.3.2.3. Interakcja leptyny i kisspeptyny w regulacji osi podwzgórze-przysadka-gonady

Biorąc pod uwagę kluczową rolę kisspeptyny i leptyny w regulacji dojrzewania płciowego, zaproponowano hipotezę, że współdziałają one ze sobą, zapewniając prawidłowe

funkcjonowanie osi HPG. U owiec wykazano, że neurony kisspeptynowe zlokalizowane w obrębie ARC reagują na podanie leptyny (Backholer i in., 2010). Ponadto leptyna wpływa na ekspresję *Kiss1* w podwzgórzu – jej podanie myszom *ob/ob* prowadzi do zwiększenia ekspresji *Kiss1* (Smith i in., 2006). W tej samej pracy wykazano obecność transkryptu kodującego receptor leptyny w neuronach kisspeptynowych ARC.

Kolejne badania potwierdziły, że nadmierna dostępność pokarmu na wczesnych etapach życia prowadzi do zwiększonej masy ciała, podwyższonego stężenia leptyny w krążeniu oraz wzrostu ekspresji *Kiss1* w podwzgórzu. Z kolei ograniczona podaż kalorii wywoływała efekt przeciwny, co sugeruje, że sygnalizacja z udziałem leptyny może modulować poziom sygnału kisspeptynowego w zależności od stanu metabolicznego organizmu (Castellano i in., 2011). Należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkie dostępne dane jednoznacznie potwierdzają bezpośrednią zależność pomiędzy leptyną a aktywnością neuronów kisspeptynowych (Donato i in., 2011).

Przyjmuje się, że przed osiągnięciem dojrzałości płciowej neurony kisspeptynowe zlokalizowane w ARC nie wykazują ekspresji funkcjonalnego receptora leptyny (Cravo i in., 2013). Mimo to istnieje wyraźna zależność pomiędzy poziomem leptyny a momentem rozpoczęcia dojrzewania płciowego, w którym bezsprzecznie uczestniczą neurony produkujące kisspeptynę. Sugeruje to, że przedpokwitaniowy wpływ leptyny na neurony kisspeptynowe w ARC może być przekazywany głównie za pośrednictwem innych populacji neuronów. Jednym z proponowanych mechanizmów jest aktywacja neuronów produkujących tlenek azotu, które uczestniczą w regulacji ekspresji kisspeptyny w ARC (Petrine i in., 2020). Ponadto badania Manfredi-Lozano i współpracowników (2016) wskazują na istotną rolę neuronów produkujących melanokortynę alfa (α -MSH), będącą produktem genu *Pomc*, jako kolejnego ogniwa łączącego sygnały metaboliczne, takie jak leptyna, z regulacją dojrzewania płciowego. W mózgach młodych gryzoni wykazano obecność włókien α -MSH będących w bliskim kontakcie z neuronami kisspeptynowymi zlokalizowanymi w ARC. Farmakologiczne blokowanie receptorów melanokortynowych opóźniało dojrzewanie płciowe, czemu towarzyszył spadek ekspresji *Kiss1* w ARC. Natomiast u myszy pozbawionych receptora kisspeptyny podanie agonistów receptorów α -MSH osłabiło stymulujący wpływ α -MSH na wydzielanie LH.

Warto również podkreślić, że leptyna może oddziaływać nie tylko w obrębie podwzgórza, lecz także na innych poziomach osi HPG. Na poziomie przysadki wykazano, że leptyna w niewielkim stopniu stymuluje wydzielanie gonadotropin (Yu i in. 1997). W obrębie gonad natomiast odnotowano zarówno pobudzające, jak i hamujące działanie leptyny na różne aspekty ich funkcjonowania, w tym na steroidogenezę oraz produkcję hormonów płciowych (Tena-Sempere, 2007; Ghizzoni i in., 2001).

1.3.3. Folikulogeneza

1.3.3.1. Struktura i rozwój pęcherzyka jajnikowego

Pęcherzyk jajnikowy jest podstawową strukturą jajnika odpowiedzialną za rozwój, dojrzewanie i uwalnianie komórki jajowej w procesie owulacji. Budują go komórka jajowa (oocyt) otoczona komórkami ziarnistymi (ang. *granulosa cells*) oraz osłonki (ang. *theca cells*). Osłonka składa się z dwóch morfologicznie odrębnych typów komórek: steroidogennych komórek osłonki wewnętrznej (łac. *theca interna*), które wytwarzają androgeny oraz komórek osłonki

zewnątrznej (łac. *theca externa*), zapewniających rosnącemu pęcherzykowi wsparcie strukturalne.

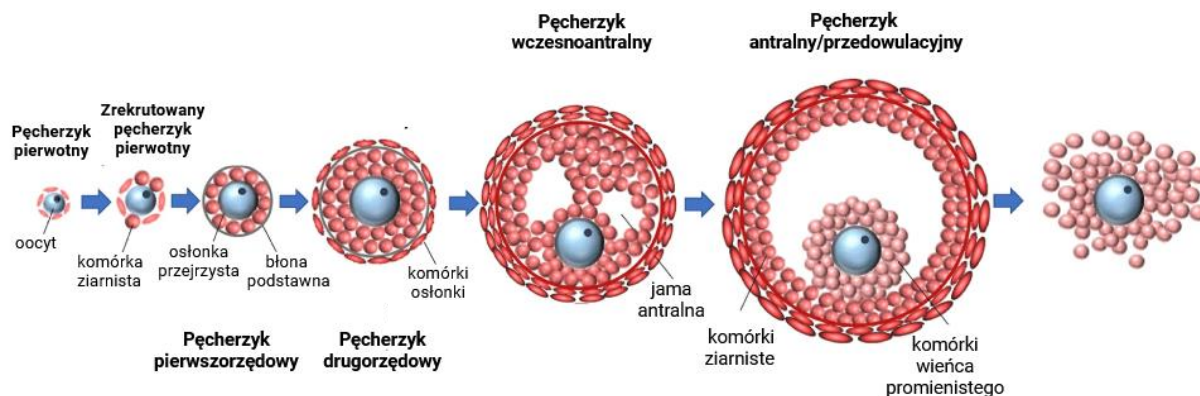
Rozwój pęcherzyków jajnikowych, określane jako folikulogeneza, jest wieloetapowym i precyzyjnie regulowanym procesem prowadzącym do powstania dojrzałego pęcherzyka zdolnego do owulacji. Proces ten pozostaje pod kontrolą sygnałów hormonalnych oraz zmian metabolicznych zachodzących zarówno w oocycie, jak i komórkach somatycznych pęcherzyka.

Pęcherzyki jajnikowe przechodzą kolejne stadia rozwoju, które dzieli się na pęcherzyki przedantralne – pozbawione jamy antralnej oraz na pęcherzyki antralne, w których jama ta jest obecna (Macklon i Fauser, 2001; Hillier, 2001). Proces dojrzewania pęcherzyków, zilustrowany na rycinie 1.3, rozpoczyna się na etapie pęcherzyków pierwotnych, w których oocyt otoczony jest pojedynczą warstwą płaskich komórek ziarnistych. Podział oocytów w tej fazie jest zatrzymany w profazie I podziału mejotycznego. Pęcherzyki pierwotne stanowią tzw. rezerwę jajnikową, będąc pulą spoczynkową, z której rekrutowane są pęcherzyki zdolne do dalszego rozwoju.

W kolejnym etapie rozwoju pęcherzyki pierwotne przechodzą w stadium pęcherzyków pierwszo- i drugorzędowych, które charakteryzują się odpowiednio jedną lub dwiema warstwami komórek ziarnistych. Oocyt pęcherzyka pierwotnego posiada glikoproteinową otoczkę zwaną osłonką przejrzystą (łac. *zona pellucida*), która oddziela go od komórek ziarnistych osadzonych na błonie podstawnej (łac. *lamina basalis*; Braw-Tal i Yossefi, 1997). Na etapie pęcherzyka drugorzędowego rozpoczyna się różnicowanie komórek osłonki. Pęcherzyki te stają się wrażliwe na działanie gonadotropin i zaczynają syntetyzować steroidowe hormony płciowe (Yamamoto i in., 1992; Zhang i in., 2001; Yung i in., 2014).

Wraz z dalszym dojrzewaniem pęcherzyka zwiększa się liczba warstw komórek ziarnistych, a pomiędzy nimi zaczynają tworzyć się drobne przestrzenie wypełnione płynem pęcherzykowym. Przestrzenie te stopniowo powiększają się i łączą, prowadząc do uformowania pojedynczej, centralnie położonej jamy antralnej (łac. *antrum*). Niektóre metody klasyfikacji pęcherzyków wyróżniają dodatkowo stadium pęcherzyka wczesnoantralnego, charakteryzującego się obecnością wielu warstw komórek ziarnistych oraz początkowo formującą się jamą antralną (Vo i Kawamura, 2021; Findlay i in., 2019).

Na etapie pęcherzyka antralnego jama antralna jest już w pełni wykształcona. Jedynie niewielka liczba pęcherzyków antralnych, pod wpływem stymulacji gonadotropinowej, dojrzewa do stadium przedowulacyjnego (Hirshfield, 1991), a pozostałe ulegają atrezji. Pęcherzyki przedowulacyjne, określane jako pęcherzyki Graafa, stanowią główne źródło estrogenów u kobiet w wieku rozrodczym. W odpowiedzi na przedowulacyjny wyrzut LH dominujący pęcherzyk Graafa pęka (u zwierząt z pojedynczą owulacją), uwalniając oocyt, podczas gdy komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej ulegają luteinizacji, przekształcają się w ciało żółte (Fauser i Van Heusden, 1997). Dalszy los ciała żółtego zależy od zapłodnienia komórki jajowej. W przypadku zapłodnienia, przekształca się ono w ciało żółte ciążowe, produkujące progesteron. Natomiast gdy do zapłodnienia nie dochodzi, ciało żółte ulega stopniowej regresji, tracąc zdolność do produkcji hormonów, aż ostatecznie przekształca się w ciało białawe i zanika (Maynard i Downes, 2019).



Ryc. 1.3 Schemat folikulogenezy (zmodyfikowano wg Longo i in., 2025). Pęcherzyki jajnikowe przechodzą kolejne stadia rozwoju, począwszy od pęcherzyków pierwotnych zawierających oocyty otoczone pojedynczą warstwą komórek ziarnistych, poprzez pęcherzyki jedno- i dwuwarstwowe (pierwszo- i drugorzędowe), aż do stadium pęcherzyka antralnego, charakteryzującego się obecnością jamy antralnej wypełnionej płynem pęcherzykowym.

Komórki ziarniste odgrywają kluczową rolę w zapewnianiu oocytowi wsparcia oraz odpowiedniego mikrośrodowiska niezbędnego do jego wzrostu i dojrzewania. W trakcie rozwoju pęcherzyka różnicują się one na dwie funkcjonalnie odmienne populacje: przyścienne komórki ziarniste (MGCs, ang. *mural granulosa cells*) oraz komórki wieńca promienistego (CCs, ang. *cumulus cells*). MGCs, zlokalizowane na ścianie pęcherzyka, pełnią głównie funkcje endokryne, podczas gdy CCs, pozostając w bezpośrednim kontakcie z oocytem, tworzą kompleksy oocyt-wieniec promienisty (COCs, ang. *cumulus-oocyte complexes*) i dostarczają mu niezbędnych składników odżywczych oraz energii (Johnson i Redmer, 2002; Scott, 2018).

W obrębie COCs zachodzi dwukierunkowa komunikacja pomiędzy oocytem a komórkami wieńca promienistego. Jest ona możliwa dzięki obecności wytwarzanych przez komórki pęcherzyka wypustek cytoplazmatycznych (TZPs, ang. *transzonal projections*), które przechodzą przez osłonkę przejrzystą i kontaktują się bezpośrednio z oocytem (Anderson i in., 1976). Dodatkowo pomiędzy oocytem a komórkami wieńca promienistego tworzą się liczne połączenia szczelinowe (ang. *gap junctions*), które umożliwiają wymianę jonów, małych cząsteczek oraz wtórnych przekaźników zgodnie z gradientem stężeń (Kidder i Mhawi, 2002).

1.3.3.2. Wpływ hormonów na dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych

1.3.3.2.1 Gonadotropiny

Folikulogeneza jest wieloetapowym procesem, którego przebieg zależy od ścisłej współpracy lokalnych czynników wydzielanych w jajniku z regulacją hormonalną sprawowaną przez oś HPG. Początkowo zakładano, że wczesne etapy rozwoju pęcherzyków jajnikowych, aż do momentu utworzenia jamy antralnej, przebiegają niezależnie od działania gonadotropin, ponieważ mogą zachodzić przy ich bardzo niskich stężeniach (Hillier, 1994; Halpin i in., 1986). Jednak badania z wykorzystaniem antagonistów GnRH u młodych gryzoni wykazały wyraźny spadek liczby dojrzewających pęcherzyków oraz nasilenie ich atrezji. Co więcej, egzogenne podanie FSH prowadziło do przyspieszenia rozwoju pęcherzyków jajnikowych (McGee i in., 1997). Wskazuje to, że choć najwcześniejsze etapy folikulogenezy są w dużej mierze regulowane przez lokalne sygnały parakryne, pęcherzyki jajnikowe stopniowo nabywają wrażliwość na FSH jeszcze przed osiągnięciem stadium antralnego.

Przejście pęcherzyka przez stadium antralne oraz samo wystąpienie owulacji są powszechnie uznawane za procesy zależne od aktywności gonadotropin. FSH odgrywa kluczową rolę w dojrzewaniu pęcherzyków antralnych, stymulując ekspresję enzymów zaangażowanych w syntezę estrogenów oraz zwiększając ekspresję receptorów LH w komórkach ziarnistych (Hillier, 2001). Z kolei LH jest niezbędny do ostatecznego dojrzewania pęcherzyka przedowulacyjnego oraz inicjacji owulacji – procesów, których nie można wywołać nawet przy zastosowaniu wysokich dawek FSH (Zhang i in., 2001; Pakarainen, 2005).

1.3.3.2.2 Hormony steroidowe

Hormony steroidowe syntetyzowane w jajniku pełnią istotną rolę w regulacji folikulogenezy, wpływając zarówno na dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, jak i ich funkcjonowanie. Estrogeny i androgeny oddziałują przede wszystkim na komórki ziarniste, zapewniając ich prawidłową proliferację oraz przeżywalność.

Badania na modelach mysich wykazały, że brak sygnalizacji E2 prowadzi do zahamowania rozwoju pęcherzyków na etapie wczesnych pęcherzyków antralnych (Lubahn i in., 1993). Natomiast niedobór E2 wynikający z braku aromatazy cytochromu P450 skutkuje zaburzeniem sprzężenia zwrotnego i podwyższonym poziomem gonadotropin. W takich warunkach folikulogeneza początkowo przebiega do stadium dużych pęcherzyków antralnych, jednak wraz z wiekiem zostaje całkowicie zaburzona, a w jajniku nie wykrywa się już pęcherzyków drugorzędowych (Fisher i in., 1998; Britt i in., 2000).

Zakłócenie sygnalizacji androgenowej również wywiera niekorzystny wpływ na folikulogenezę. Myszy pozbawione receptora androgenowego wykazują zmniejszoną płodność, obniżoną liczbę pęcherzyków antralnych i owulowanych oocytów oraz zwiększoną apoptozę komórek ziarnistych, co w konsekwencji prowadzi do przedwczesnej niewydolności jajników (Hu i in., 2004; Shiina i in., 2006).

1.3.3.2.3 Związki niesteroidowe

Istotną rolę w regulacji dojrzewania pęcherzyków jajnikowych odgrywają także związki niesteroidowe produkowane lokalnie w jajniku, w szczególności białka należące do nadrodziny transformującego czynnika wzrostu beta (TGF β , ang. *transforming growth factor β*). Do najważniejszych z nich zalicza się inhibiny, aktywiny, czynnik różnicowania wzrostu 9 (GDF9; ang. *growth differentiation factor 9*) oraz białko morfogenetyczne kości 15 (BMP15; ang. *bone morphogenetic protein 15*).

Aktywiny i inhibiny są blisko spokrewnionymi białkami o przeciwnych funkcjach, produkowanymi przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych. Inhibiny są heterodimerami złożonymi z podjednostki α oraz jednej z podjednostek β (β A lub β B), tworząc inhibinę A lub B. Aktywiny natomiast występują jako homo- lub heterodimery podjednostek β (β A β A, β B β B, β A β B; Ying, 1987).

Równowaga między produkcją aktywin i inhibin zmienia się w trakcie rozwoju pęcherzyków. Pęcherzyki od stadium pierwotnego do preantralnego wykazują dominującą ekspresję podjednostek β , sprzyjając syntezie aktywin. Natomiast większe, bardziej rozwinięte pęcherzyki jajnikowe wykazują zwiększoną ekspresję podjednostki α , co prowadzi do powstawania inhibiny A lub B (Hillier, 1994; Findlay, 2000), przy czym pęcherzyk dominujący produkuje głównie inhibinę A. Aktywiny i inhibiny oddziałują również

na przysadkę, regulując wydzielanie FSH w sposób przeciwny – aktywiny je stymulują, natomiast inhibiny hamują.

Badania u ludzi i na modelach mysich wskazują, że sygnalizacja aktywiny uczestniczy w formowaniu pęcherzyków pierwotnych oraz w ustalaniu liczby pęcherzyków pierwotnych tworzących rezerwę jajnikową (Bristol-Gould, 2006). Na etapie pęcherzyków przedantralnych aktywiny stymulują natomiast proliferację komórek ziarnistych, sprzyjając dalszemu wzrostowi pęcherzyka (Li i in., 1995; Zhao i in., 2001).

Od stadium antralnego dalszy wzrost i rozwój pęcherzyka stają się zależny od działania FSH. Aktywiny wydzielane przez komórki ziarniste nasilają ich proliferację, zwiększają ekspresję receptora FSH (Hasegawa i in., 1988; Xiao i in., 1992) oraz wzmagają aktywność aromatazy cytochromu P450 stymulowaną działaniem FSH (Hutchinson i in., 1987; Miro i in., 1991).

GDF9 i BMP15, syntetyzowane przez oocyt, pełnią kluczową rolę już na wczesnych etapach rozwoju pęcherzyków i pozostają niezbędne aż do momentu owulacji. U myszy pozbawionych genu *Gdf9* dochodzi do formowania pęcherzyków pierwotnych, jednak ich dalszy rozwój zostaje zahamowany na tym etapie, co sprawia, że badania funkcji GDF9 na dalszych etapach folikulogenezy opierają się głównie na modelach *in vitro* (Nilsson et al. 2002). Wykazano, że GDF9 wspiera rozwój pęcherzyków poza stadium pęcherzyka pierwotnego oraz odgrywa kluczową rolę podczas wzrostu pęcherzyka antralnego i owulacji (Vitt i Hsueh, 2001; Vitt i in., 2000). Ponadto GDF9 pośrednio wspomaga przyleganie komórek wieńca promienistego do oocytu, co zapewnia jego lepszą ochronę i ułatwia proces zapłodnienia oraz zapobiega apoptozie komórek ziarnistych pęcherzyka (Orisaka i in., 2006). Natomiast, myszy z nokautem genu *Bmp15* wykazują prawidłowy rozwój pęcherzyków do stadium antralnego, jednak występują u nich zaburzenia owulacji i zapłodnienia (Yan i in., 2001). U ludzi heterozygotyczne mutacje *BMP15* wiążą się z hipergonadotropową niewydolnością jajników oraz ograniczoną proliferacją komórek ziarnistych (Di Pasquale i in., 2004).

1.3.4. Steroidogeneza w jajniku

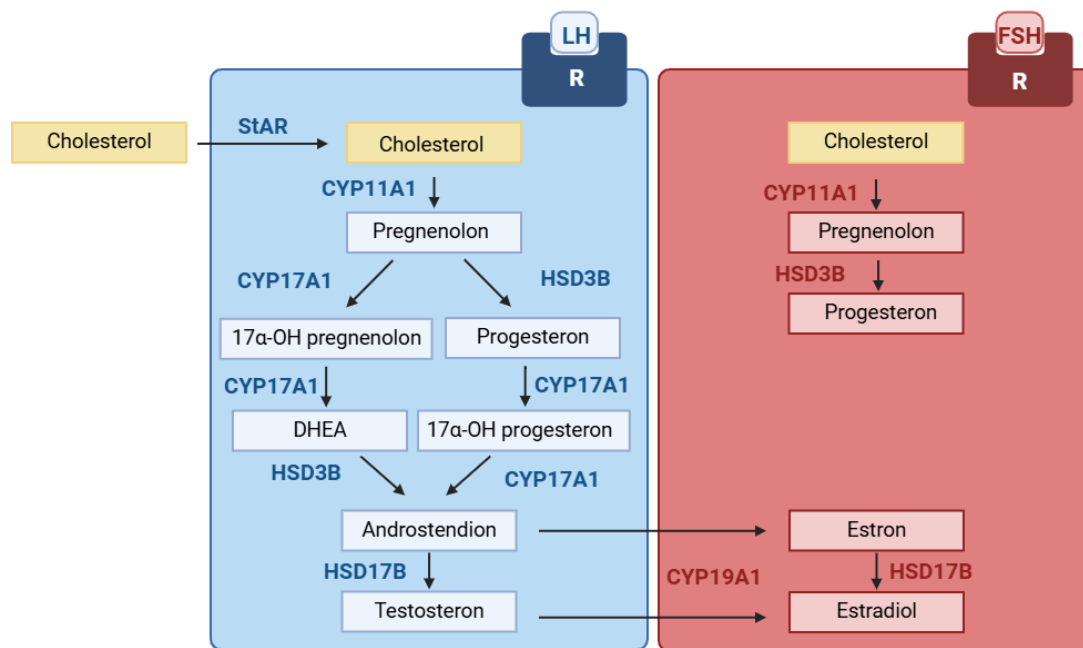
Jedną z podstawowych funkcji pęcherzyka jajnikowego jest synteza hormonów steroidowych. Steroidogeneza jajnikowa u większości ssaków, w tym u ludzi i myszy, przebiega zgodnie z klasycznym modelem dwóch komórek i dwóch gonadotropin (Ireland, 1987). Zgodnie z tym modelem androgeny syntetyzowane są z cholesterolu w komórkach osłonki wewnętrznej pod wpływem LH, a następnie przechodzą do komórek ziarnistych, gdzie pod kontrolą FSH ulegają aromatyzacji do estrogenów.

Proces steroidogenezy w jajniku, przedstawiony schematycznie na rycinie 1.4, rozpoczyna się od transportu cholesterolu, stanowiącego substrat do syntezy hormonów steroidowych, z błony zewnętrznej mitochondrium na błonę wewnętrzną. Etap ten jest regulowany przez białko StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*), które odgrywa kluczową rolę w kontroli szybkości przebiegu całego procesu. Następnie cholesterol ulega enzymatycznej konwersji do pregnenolonu, katalizowanej przez cytochrom P450_{scc} (CYP11A1), który zlokalizowany jest w mitochondriach.

Dalsze etapy steroidogenezy zachodzą w retikulum endoplazmatycznym, gdzie pregnenolon zostaje przekształcony w progesteron przy udziale dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (HSD3B). Kolejne reakcje, katalizowane przez cytochrom P450 17A1 (CYP17A1), prowadzą do powstania 17-alfahydroksypregnenolonu z pregnenolonu oraz 17-alfahydroksyprogesteronu

z progesteronu. Ten sam enzym odpowiada również za syntezę dehydroepiandrosteronu (DHEA). Większość DHEA ulega następnie przemianie do androstendionu, który może zostać dalej przekształcony w biologicznie bardziej aktywny testosteron przy udziale dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej (HSD17B; Conley i in., 1994).

Androgeny syntetyzowane w komórkach osłonki wewnętrznej dyfundują do sąsiadujących komórek ziarnistych, gdzie w przeważającej części ulegają konwersji do estrogenów. Proces ten zachodzi przy udziale aromatazy cytochromu P450 (CYP19A1), której ekspresja i aktywność są stymulowane przez FSH. Testosteron przekształcany jest w estradiol, natomiast androstendion w estron, który następnie może zostać zredukowany do estradiolu przez HSD17B (Corbin i in., 2003).



Ryc. 1.4 Schemat syntezy hormonów steroidowych w jajniku. Cholesterol jest transportowany z błony zewnętrznej mitochondrium do jego wnętrza przez białko StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*), gdzie przy udziale enzymu desmolazy cholesterolowej (CYP11A1) ulega konwersji do pregnenolonu. Następnie pregnenolon przekształcany jest w progesteron z udziałem dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (HSD3B). Kolejne reakcje, katalizowane przez cytochrom P450 17A1 (CYP17A1), prowadzą do syntezy androgenów, takich jak dehydroepiandrosteron (DHEA) oraz androstendion. Androstendion może być dalej konwertowany do testosteronu przy udziale dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej (HSD17B). W komórkach ziarnistych androgeny ulegają aromatyzacji do estrogenów – testosteron do estradiolu, a androstendion do estronu – pod wpływem aromatazy cytochromu P450 (CYP19A1). Schemat przygotowano z wykorzystaniem narzędzia BioRender.com.

1.3.5. Komórka jajowa

Od momentu rekrutacji pęcherzyka pierwotnego rozpoczyna się dojrzewanie cytoplazmatyczne oocyta, które trwa aż do owulacji. Proces ten obejmuje intensywną syntezę i gromadzenie RNA, białek oraz innych związków niezbędnych do zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodka, a także reorganizację organelli komórkowych. W tym okresie oocyt znacząco zwiększa swoje rozmiary, co wiąże się z nasileniem aktywności transkrypcyjnej i translacyjnej. W pełni dojrzała komórka jajowa zawiera znacznie większe ilości RNA i białek niż typowa komórka

somatyczna, co odzwierciedla jej wysoką aktywność metaboliczną oraz przygotowanie do pełnienia funkcji rozrodczych (Bachvarova i in., 1985).

Dojrzewanie jądrowe oocyta polega natomiast na wznowieniu podziału mejotycznego, który został zatrzymany w profazie I na wczesnym etapie rozwoju ontogenetycznego. W jego przebiegu dochodzi do rozpadu otoczki jądrowej, redukcji liczby chromosomów (haploidyzacji) oraz uwolnienia pierwszego ciała kierunkowego. Fizjologicznym sygnałem inicjującym wznowienie mejozy jest nagły wzrost stężenia LH. W konsekwencji oocyt wchodzi w drugi podział mejotyczny, który zostaje zatrzymany na etapie metafazy II (MII). W takim stanie komórka jajowa jest uwalniana z pękającego pęcherzyka Graafa podczas owulacji. Zakończenie mejozy następuje dopiero w przypadku, gdy dojdzie do zapłodnienia (Sen i Caiazza, 2013).

1.3.5.1. Mitochondria w komórce jajowej

Mitochondria pełnią w komórce szereg funkcji, z których najważniejszą jest zapewnienie energii w postaci ATP. Proces dojrzewania oocytów jest szczególnie energochłonny i wiąże się ze znacznym zapotrzebowaniem na ten związek. W trakcie dojrzewania oocyta dochodzi do gwałtownego wzrostu liczby kopii mitochondrialnego DNA (mtDNA). W pęcherzykach pierwotnych gryzoni obecnych jest około 200 kopii mtDNA (Cao i in., 2007; Cree i in., 2008), podczas gdy dojrzały oocyt może zawierać od około 180 000 do nawet 500 000 kopii, w zależności od gatunku (May-Panloup i in., 2005; Santos et al, 2006).

Mitochondria stanowią centralne miejsce zachodzenia procesów utleniania węglowodanów, lipidów i białek. Substraty te ulegają przekształceniu do acetylo-CoA, który następnie wchodzi w cykl kwasu cytrynowego (cykl Krebsa) zachodzący w macierzy mitochondrialnej. Pirogronian, będący końcowym produktem glikolizy, jest konwertowany do acetylo-CoA przez kompleks dehydrogenazy pirogronianowej, natomiast kwasy tłuszczowe podlegają β -oksydacji. Wybrane aminokwasy mogą być natomiast przekształcane bezpośrednio w metabolity pośrednie cyklu Krebsa.

Wymienione procesy prowadzą do powstania zredukowanych nukleotydów: NADH i FADH₂, które przekazują elektrony do mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów. Transport ten zachodzi poprzez kompleksy I-IV łańcucha oddechowego zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Przepływ elektronów przez kolejne kompleksy skutkuje pompowaniem protonów (H⁺) do przestrzeni międzybłonowej, co skutkuje wytworzeniem potencjału błonowego mitochondrium (MMP, ang. *mitochondrial membrane potential*). Powstały gradient protonowy stanowi siłę napędową dla kompleksu V (syntazy ATP), umożliwiając syntezę ATP (Osellame i in., 2012). Proces ten, określany jako fosforylacja oksydacyjna, jest najbardziej wydajnym mechanizmem produkcji ATP w komórce.

Oddychanie mitochondrialne, oprócz wytwarzania energii, prowadzi również do powstania produktów ubocznych, takich jak reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Ich nadmierna akumulacja może prowadzić do stresu oksydacyjnego, skutkującego uszkodzeniem białek, lipidów oraz mtDNA. Podwyższony poziom ROS w oocycie jest jednym z kluczowych czynników obniżonej płodności, szczególnie u kobiet w starszym wieku, u których obserwuje się stopniowy spadek funkcji mitochondrialnych oraz wzrost stresu oksydacyjnego (Sasaki i in., 2019). Zwiększona produkcja ROS wiąże się również z obniżonym odsetkiem zapłodnień oraz zmniejszoną przeżywalnością zarodków (Bedaiwy i in., 2004).

1.3.5.2. Metabolizm komórki jajowej

COCs wykorzystują glukozę jako jedno z głównych źródeł energii. Zdolność samego oocytu do bezpośredniego metabolizmu glukozy jest jednak ograniczona, co wynika zarówno z niskiej ekspresji transporterów glukozy, jak i ze słabej aktywności kluczowych enzymów glikolitycznych, w tym fosfofruktokinazy (Cetica i in., 2002). Z tego względu istotną rolę w dostarczaniu substratów energetycznych do oocytu pełnią otaczające go komórki ziarniste, które efektywnie metabolizują glukozę do pirogronianu, mleczanu oraz NADPH. Spośród tych metabolitów oocyt preferencyjnie wykorzystuje pirogronian jako bezpośrednie źródło energii (Wang i in., 2012).

Wraz z postępem dojrzewania COCs obserwuje się istotny wzrost zużycia glukozy – dojrzałe kompleksy zużywają jej niemal dwukrotnie więcej niż niedojrzałe, co odzwierciedla rosnące zapotrzebowanie energetyczne podczas przygotowania oocytu do zapłodnienia (Sutton i in., 2003; Richani i in. 2021). Co istotne, oocyt nie jest jedynie biernym odbiorcą substratów energetycznych, lecz aktywnie reguluje metabolizm komórek ziarnistych, wpływając na ekspresję genów związanych z glikolizą (Sugiura i in., 2005). Wykazano, że usunięcie oocytów z COCs prowadzi do spadku poziomu transkryptów kodujących enzymy glikolityczne w komórkach wieńca promienistego, natomiast ponowne wprowadzenie komórki jajowej odwraca ten efekt, co potwierdza istnienie ścisłej, dwukierunkowej regulacji metabolicznej między oocytem a otaczającymi go komórkami.

Kwasy tłuszczowe stanowią alternatywne, wysokoenergetyczne źródło energii dla oocytu, dostarczając znacznie więcej ATP niż glukoza. Występują one zarówno w samym oocycie, jak i w komórkach wieńca promienistego oraz innych komórkach pęcherzyka jajnikowego, a także w płynie pęcherzykowym (Bertevello i in., 2018). Mogą być obecne w postaci wolnych cząsteczek w cytoplazmie lub magazynowane jako trójglicerydy w kroplach lipidowych. Ich metabolizm zachodzi głównie poprzez β -oksydację, która odgrywa kluczową rolę w prawidłowym dojrzewaniu oocytu (Dunning i in., 2010). Hamowanie tego procesu prowadzi do zmniejszenia liczby dojrzałych oocytów (Sanchez-Lazo i in., 2014) oraz opóźnienia wznowienia mejozy (Downs i in., 2009).

Nadmierna akumulacja lipidów w oocycie może skutkować lipotoksycznością, choć precyzyjne granice bezpiecznego poziomu lipidów pozostają nieokreślone. Występują przy tym wyraźne różnice międzygatunkowe w zawartości kropli lipidowych – oocyty myszy, szczura i człowieka zawierają ich znacznie mniej w porównaniu z oocytami świń, bydła i owiec (McEvoy i in., 2000; Arena i in., 2021). Istotną rolę ochronną w warunkach zwiększonej podaży kwasów tłuszczowych pełnią komórki wieńca promienistego, które mogą kumulować nadmiar lipidów, ograniczając w ten sposób ich potencjalnie szkodliwy wpływ na oocyt (Aardema i in., 2013).

1.3.5.3. Wpływ stanu odżywienia na metabolizm i jakość oocytu

Metabolizm oocytu pozostaje ściśle powiązany z ogólną kondycją metaboliczną organizmu. Zaburzenia takie jak otyłość lub niedożywienie mogą prowadzić do istotnych zmian w komórce jajowej, wpływając na jej jakość, kompetencje rozwojowe oraz zdolność do zapłodnienia.

Badania przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że dieta wysokotłuszczowa i wynikająca z niej otyłość wywierają niekorzystny wpływ na profil metaboliczny oocytów. Czterotygodniowe stosowanie diety wysokotłuszczowej prowadziło do zwiększenia akumulacji lipidów w obrębie COCs, indukcji apoptozy komórek wieńca promienistego oraz

komórek ziarnistych, a także do obniżenia MMP (Wu i in., 2010). Wydłużenie czasu ekspozycji do sześciu tygodni skutkowało dodatkowymi zaburzeniami funkcji mitochondrialnych w oocytach, w tym wzrostem poziomu ROS oraz obniżeniem stężenia glutationu – jednego z najważniejszych antyoksydantów komórkowych. Oocyty te wykazywały również obniżony potencjał rozwojowy, co przejawiało się mniejszą zdolnością do osiągnięcia stadium blastocysty po zapłodnieniu (Igosheva i in., 2010).

Coraz więcej danych wskazuje także, że dieta wysokokaloryczna może wywierać długofalowy, w tym transgeneracyjny, wpływ na metabolizm oocytu. Wykazano, że spożywanie przez samice diety bogatej w tłuszcze i cukry w okresie poprzedzającym ciążę, w trakcie jej trwania oraz podczas laktacji prowadzi do zmniejszenia masy mitochondriów oraz obniżenia poziomu ATP w oocytach potomstwa, a efekt ten był obserwowany aż do pokolenia F3 (Andreas i in., 2019). W interpretacji tych wyników należy jednak uwzględnić definicje efektów międzypokoleniowych i transgeneracyjnych przedstawionych w rozdziale 1.2.

W przeciwieństwie do stosunkowo dobrze poznanego wpływu diety wysokotłuszczowej, konsekwencje niedożywienia i restrykcji kalorycznej dla metabolizmu oocytu pozostają mniej jednoznaczne. Dotychczasowe wyniki badań sugerują, że umiarkowana restrykcja kaloryczna może chronić oocyty przed zmianami związanymi z procesem starzenia, takimi jak nieprawidłowa agregacja mitochondriów czy obniżony poziom ATP (Selesniemi i in., 2011). Z kolei analizy przeprowadzone na COCs pozyskanych od kobiet z niedowagą wykazały obecność nieprawidłowości morfologicznych mitochondriów w komórkach wieńca promienistego, przy braku istotnych zmian w liczbie mtDNA oraz w potencjale błony mitochondrialnej (Ji i in., 2024). Wyniki te wskazują, że wpływ niedożywienia na metabolizm oocytu może być bardziej subtelny i zależny od czasu trwania oraz stopnia deficytu energetycznego.

2. Cel pracy

Wczesne etapy życia, w szczególności okres embriogenezy i wczesny okres postnatalny, to czas intensywnego wzrostu organizmu oraz dynamicznego rozwoju i dojrzewania narządów i tkanek. Zarówno niedobór, jak i nadmiar składników odżywczych w tych krytycznych okresach wrażliwości mogą trwale modyfikować rozwijające się struktury, zwiększając ryzyko chorób – zwłaszcza metabolicznych – a skutki tych oddziaływań mogą być przekazywane kolejnym pokoleniom, kształtując ich podatność na choroby cywilizacyjne. Równowaga energetyczna jest również kluczowym warunkiem prawidłowego funkcjonowania układu rozrodczego, którego centralnym elementem regulacyjnym jest oś HPG, wrażliwa na sygnały metaboliczne, napływające z innych układów organizmu, w tym na hormony syntetyzowane przez tkankę tłuszczową. Pomimo rosnącej liczby badań, wpływ niedoborów lub nadmiaru energii we wczesnych etapach życia na długofalowe programowanie funkcji rozrodczych, realizowane przez oś HPG, pozostaje nadal niewystarczająco poznany.

W świetle danych dostępnych w literaturze naukowej postawiono następującą hipotezę:

Stres żywieniowy doświadczony w okresie laktacji – stanowiącym krytyczne postnatalne okno programowania rozwoju potomstwa – jest istotnym bodźcem programującym, który poprzez zmiany środowiska metabolicznego i hormonalnego we wczesnym etapie życia może zaburzać dojrzewanie osi HPG oraz wpływać na potencjał rozrodczy potomstwa, również w kolejnych pokoleniach.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu przejściowego stresu żywieniowego w okresie postnatalnym, wynikającego z ograniczonej podaży energii, składników odżywczych oraz substancji bioaktywnych w mleku matki (pokolenie F0), na funkcjonowanie osi HPG u potomstwa płci żeńskiej, z uwzględnieniem bezpośrednich efektów w pokoleniu F1 oraz potencjalnych długofalowych konsekwencji w kolejnym pokoleniu (F2), które nie było bezpośrednio narażone na niedożywienie.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ocenę fenotypu rozrodczego samic z pokoleń F1 i F2.
2. Ocenę zmian morfologicznych oraz profilu transkryptomycznego gonad samic z pokoleń F1 i F2.
3. Analizę statusu metabolicznego komórek jajowych samic z pokoleń F1 i F2.
4. Analizę zmian w ekspresji genów i białek związanych z funkcją układu kisspeptynowego w podwzgórzu oraz ocenę odpowiedzi neuronów na sygnały metaboliczne u samic z pokolenia F1.

3. Materiały i metody

3.1. Podstawowe związki chemiczne, roztwory, zestawy odczynników, materiały i aparatura

Tabela 3.1. Podstawowe związki chemiczne i odczynniki

Związek chemiczny / odczynnik	Producent
4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, USA
Aceton	Avantor Performance Materials, Polska
Agaroz	EURX Molecular Biology Products, Polska
Agaroz o niskiej temp. topnienia	Serva, Niemcy
Alkohol etylowy bezwodny 99,8%	Avantor Performance Materials, Polska
Azydek sodu	Avantor Performance Materials, Polska
BIO-GEL P-60	Bio-Rad, USA
Celuloza CF-11	Cytiva, USA
Chloramina T	Sigma Aldrich, USA
Chlorek potasu (KCl)	Avantor Performance Materials, Polska
Chlorek sodu (NaCl)	Avantor Performance Materials, Polska
Difosforan sodu (Na_2HPO_4)	Avantor Performance Materials, Polska
Diwodorofosforan potasu (KH_2PO_4)	Avantor Performance Materials, Polska
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Stanlab, Polska
Glicerol	Sigma Aldrich, USA
Glikol etylenowy	Sigma Aldrich, USA
Izopentan	Fluka Chemicals, Szwajcaria
Jod ^{125}J	Perkin Elmer, USA
Kwas acetylosalicylowy	Merck Millipore, USA
Medium montażowe DPX (ang. <i>Distrene Plasticiser Xylene</i>)	Merck Millipore, USA
Medium OCT (ang. <i>Optimal Cutting Temperature</i>)	Bio-optica, Włochy
Nadtlenek wodoru	Avantor Performance Materials, Polska
NDS (ang. <i>normal donkey serum</i>)	Jackson ImmunoResearch Labs, USA
NGS (ang. <i>normal goat serum</i>)	Merck Millipore, USA

Paraformaldehyd	Avantor Performance Materials, Polska
Pirogronian sodu	Thermo Fisher Scientific, USA
Pirosiarczyn sodowy	Sigma Aldrich, USA
Polietyloglikol (PEG)	Sigma Aldrich, USA
Resin	Bio-Rad, USA
Sacharoza	Avantor Performance Materials, Polska
Substytut ksylenu ParaLast	Leica, Niemcy
Triton X-100	Sigma Aldrich, USA
Trizma Base	Sigma Aldrich, USA
Tween-20	Sigma Aldrich, USA
Wersenian dwusodowy (EDTA)	Sigma Aldrich, USA
Wodorowęglan sodu (NaHCO ₃)	Avantor Performance Materials, Polska

Tabela 3.2 Podstawowe roztwory

Roztwór	Skład
Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (PBS) pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ddH ₂ O
4% roztwór paraformaldehydu pH 6,9	Paraformaldehyd – substancja stała PBS pH 7,4
30% roztwór sacharozy	Sacharoza – substancja stała PBS pH 7,4
PBST	PBS pH 7,4 0,2% Triton X-100
TBS pH 7,45	50 mM Trizma Base 150 mM NaCl
TBST	50 mM Trizma Base 150 mM NaCl 0,1% Tween-20
Roztwór do krioprotekcji tkanek	50% PBS 30% glicerol 30% glikol etylenowy

Stabilizator do krwi pH 7,4	0,3 M EDTA 1% kwas acetylosalicynowy ddH ₂ O
Roztwór do trawienia tkanki	50 mM Trizma Base 25 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS 0,02% azydek sodu

Tabela 3.3 Gotowe zestawy odczynników

Zestaw	Nr kat.	Zastosowanie	Producent
Androstendione ELISA kit	E03A0878	Oznaczenie poziomu androstendionu w osoczu	BlueGene Biotech, Chiny
Leptin ELISA Kit	EM0129	Oznaczenie poziomu leptyny w osoczu	Fine Test Biotech, Chiny
Mouse Progesterone ELISA Kit	80559	Oznaczenie poziomu progesteronu w osoczu	Crystal Chem, USA
Zestaw do oznaczenia poziomu LH metodą radioimmunologiczną	-	Oznaczenie poziomu LH w osoczu	Zestaw dostarczony przez Dr A. F. Parlow [Scientific Director, NATIONAL HORMONE & PEPTIDE PROGRAM, HARBOR-UCLA MEDICAL CENTER, 1124 W. CARSTON ST., TORRANCE, CA, USA]
QIAamp® DNA Mini Kit	51306	Izolacja całkowitego DNA	QIAGEN, Niemcy
RNeasy® Mini Kit	74106	Izolacja całkowitego RNA	QIAGEN, Niemcy
Agilent RNA 6000 Nano	5067-1511	Ocena jakości RNA	Agilent Technologies, USA
TaqMan™ RNA-to Ct1-Step Kit	4392653	RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific, USA
KAPA2G Fast HotStart	KK5510	Genotypowanie	Roche, Szwajcaria
KAPA PROBE FAST	KK40702	Genotypowanie	Roche, Szwajcaria
ARCTURUS® PicoPure DNA Extraction Kit	KIT0103	Izolacja DNA z komórek jajowych	Thermo Fisher Scientific, USA

QuantStudio 3D™ Digital PCR 20K Chip Kit v2.	A26316	Oznaczenie liczby kopii mtDNA w pojedynczym oocyte	Thermo Fisher Scientific, USA
Hematoxylin and Eosin Stain Kit	ab245880	Barwienie tkanki	Abcam, Wielka Brytania
ProLong™ Gold Antifade Mountant	P10144	Zaklejanie szkiełek	Thermo Fisher Scientific, USA
RNAScope™ Multiplex Fluorescent Kit V2	323100	Hybrydyzacja <i>in situ</i>	ACD Bio, USA
Opal™ 520 Reagent Pack	FP1487001KT	Hybrydyzacja <i>in situ</i>	AKOYA Biosciences, USA
Opal™ 570 Reagent Pack	FP1488001KT	Hybrydyzacja <i>in situ</i>	AKOYA Biosciences, USA
Opal™ 650 Reagen Pack	FP1496001KT	Hybrydyzacja <i>in situ</i>	AKOYA Biosciences, USA
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	G7570	Określenie poziomu ATP produkowanego przez oocyty	Promega, USA
BODIPY™ 493/503	D3922	Ocena poziomu lipidów neutralnych w oocytach	Thermo Fisher Scientific, USA
CellROX™ Orange Reagent	C10443	Ocena poziomu stresu oksydacyjnego w oocytach	Thermo Fisher Scientific, USA
JC-1 Dye	T3168	Ocena potencjału błony mitochondrialnej oocytów	Thermo Fisher Scientific, USA

Tabela 3.4 Leki i hormony

Nazwa handlowa	Producent	Dawka	Substancja aktywna
Iso-Vet	Chanelle Pharma, Irlandia	3-4% - indukcja 1-2% - podtrzymanie	Izofluran
Ketamina	Biowet Puławy, Polska	100-230 mg/kg masy ciała	Ketamina
Xylapan®	Vetoquinol, Polska	10-16 mg/kg masy ciała	Ksylazyna
PMSG-Intervet®	MSD Animal Health, Polska	7.5 UI	Gonadotropina z surowicy ciężarnych kłacz
CHORULON®	MSD Animal Health, Polska	10 IU	Gonadotropina kosmówkowa
HyperOVA®	Cosmo Bio, USA	100 µL	Gonadotropina kosmówkowa; Surowica zawierająca przeciwciała przeciwko inhibinie
Recombinant murine leptin	PeProTech	100 ng/mL – eksperyment in vitro	Leptyna

Tabela 3.5 Podstawowe materiały zużywalne

Material	Producent
Szkiełka podstawowe X-tra Adhesive	Leica, Niemcy
Szkiełka nakrywkowe	Equimed, Polska
Płytki 12-dołkowe	Eppendorf, Niemcy
Płytki 4-dołkowe	Thermo Fisher Scientific, USA
Płytki 384-dołkowe	Thermo Fisher Scientific, USA
Narzędzia chirurgiczne	Fine Science Tools, USA

Tabela 3.6 Aparatura badawcza

Urządzenie	Producent
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System	BIO-RAD, USA
Czytnik płytek ELISA	Biotek, USA
Licznik promieniowania gamma Wizard 2470	Perkin Elmer, USA

Homogenizator Fast Prep-24™	MP Biomedicals, USA
Kriostat CM1950	Leica, Niemcy
Mikroskop fluorescencyjny Axio Observer Z1	Carl-Zeiss, Niemcy
Mikroskop konfokalny LSM800	Carl-Zeiss, Niemcy
Mikroskop Olympus BX43	Olympus, Japonia
Minispec LF90II	Bruker, USA
MyGlo™ Reagent Reader	Promega, USA
Piec do hybrydyzacji <i>in situ</i> HyBEZ™ II	ACD Bio, USA
ProFlex™ PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA
QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader	Thermo Fisher Scientific, USA
Skaner histologiczny Panoramic MIDI	3DHISTECH Kft., Węgry
Spektrofotometr NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, USA
ViiA™ 7 PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA
Wibratom VT1200	Leica, Niemcy

3.2. Warunki utrzymania zwierząt i opis modelu doświadczalnego

3.2.1. Warunki hodowlane

Wszystkie opisane doświadczenia wykonane zostały zgodnie z procedurami, na które zgodę wydała Lokalna Komisja Etyczna ds. doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie, we wnioskach:

- „Programowanie żywieniowe podczas laktacji: identyfikacja szlaków molekularnych warunkujących prawidłowe funkcjonowanie osi podwzgorze-przysadka-gonady i rozwój gonad” – 83/2019 z uchwalonymi zmianami.
- „Programowanie żywieniowe podczas okresu laktacji – droga do zaburzeń płodności u kolejnych pokoleń?” – 39/2023 z uchwalonymi zmianami.

Zwierzęta przebywały w standardowych warunkach hodowlanych w Zwierzętarni Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Przed rozpoczęciem eksperymentu żywieniowego utrzymywane były w klatkach bytowych (maksymalnie 5 osobników/klatkę). Myszy miały nieograniczony dostęp do pożywienia i wody oraz zapewniono im odpowiednie warunki bytowania: temperaturę (21-23°C), wilgotność powietrza (50-60%), 12-godzinny cykl dobowy oraz wzbogacone środowisko.

Zwierzętarnia Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie spełnia standardy utrzymania zwierząt oraz prowadzenia doświadczeń określone w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/EU z dnia 22 września 2010 roku (*tekst skonsolidowany, z późn. zm.*) w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów

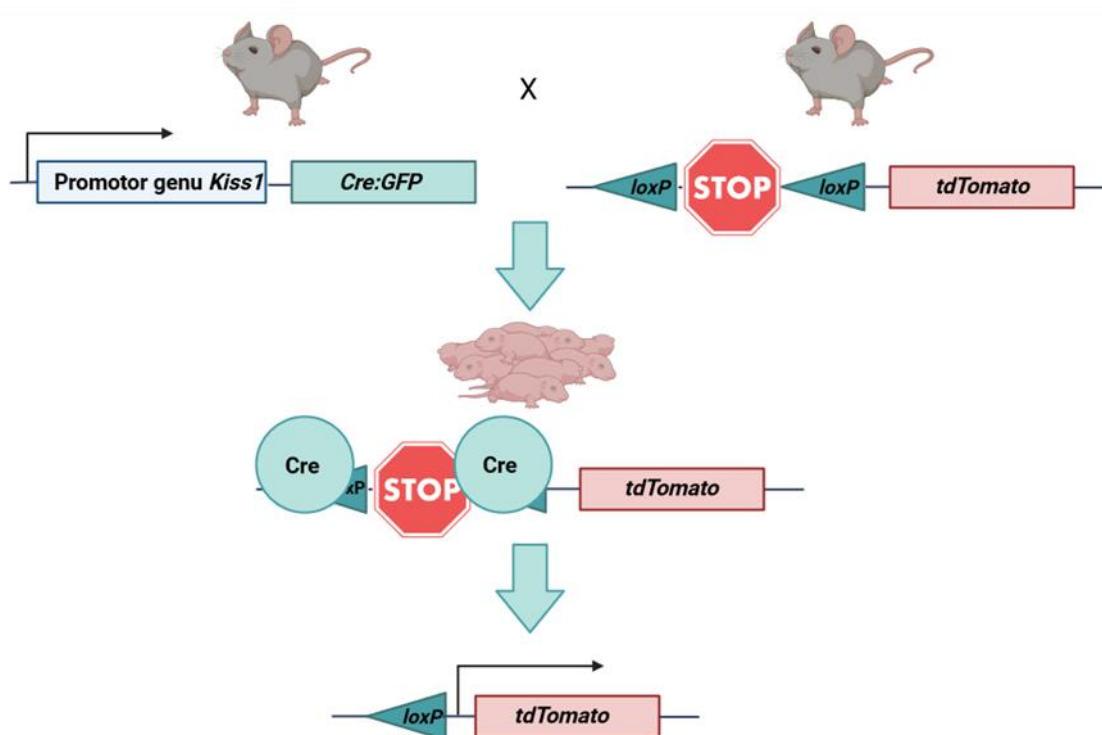
naukowych oraz zgodne z przepisami krajowymi: ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015 poz. 266, z późn. zm.).

3.2.2. Zwierzęta typu dzikiego

W niniejszej pracy badania przeprowadzono na modelu myszy domowej (*Mus musculus*). Zwierzęta szczepu dzikiego C57BL/6J pozyskano z hodowli w Centrum Medycyny Doświadczalnej Akademii Medycznej w Białymstoku, po czym hodowano je w Zwierzętarni Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, w celu wygenerowania kolejnych pokoleń myszy stosowanych w doświadczeniach. W badaniach wykorzystano samice szczepu dzikiego C57BL/6J w wieku 21 dni oraz dorosłe samice w przedziale wiekowym 2-3 miesięcy.

3.2.3. Zwierzęta transgeniczne

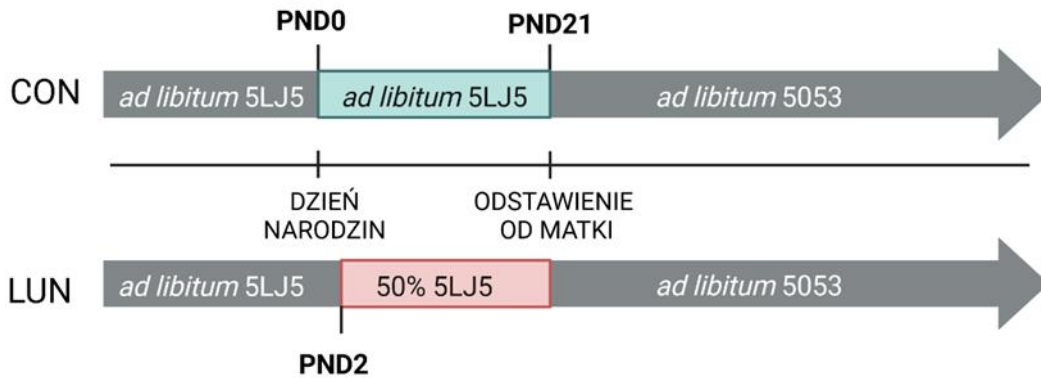
W doświadczeniach zastosowano również dwie linie myszy transgeniczných dostarczonych przez The Jackson Laboratory (USA). U pierwszej z nich (033169; B6(129S4)-*Kiss1*^{tm1.1(cre/EGFP)Rpa/J}) w komórkach wykazujących ekspresję genu *Kiss1* ekspymowana jest rekombinaza Cre sprzężona z genem reporterowym GFP (Padilla i in., 2018). Sekwencję Cre:GFP, kodującą białko fuzyjne, wprowadzono w miejsce regionu kodującego pierwszy ekson genu *Kiss1*. Druga z linii transgeniczných (007914; B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze/J}), tzw. linia reporterowa, posiada kasetę STOP oflankowaną sekwencjami *loxP* (ang. *locus of X-over P1*), które tworzą barierę dla transkrypcji genu kodującego białko fluorescencyjne tdTomato pod kontrolą promotora CAG. Wymienione sekwencje wstawiono w locus *Gt(ROSA)26Sor* (Madisen i in., 2010). Białko Cre, po związaniu z fragmentami loxP, katalizuje rekombinację DNA pomiędzy tymi fragmentami. Odpowiednie zorientowanie fragmentów loxP (5'-3') względem siebie skutkuje wycięciem sekwencji znajdującej się między nimi. W wyniku krzyżowania myszy linii 033169 i 007914 usunięto kodon STOP poprzedzający sekwencję kodującą białko tdTomato, co pozwoliło uzyskać potomstwo z ekspresją tego białka fluorescencyjnego w neuronach kisspeptynowych (Ryc. 3.1). Na potrzeby niniejszej pracy myszy te określono mianem *Kiss*^{CreROSA26}. Zwierzęta posłużyły do wizualizacji neuronów kisspeptynowych podwzgórza. Mózgowie od myszy *Kiss*^{CreROSA26} pobierano w 8 i 21 dniu życia oraz od dorosłych samic po osiągnięciu pełnej dojrzałości płciowej.



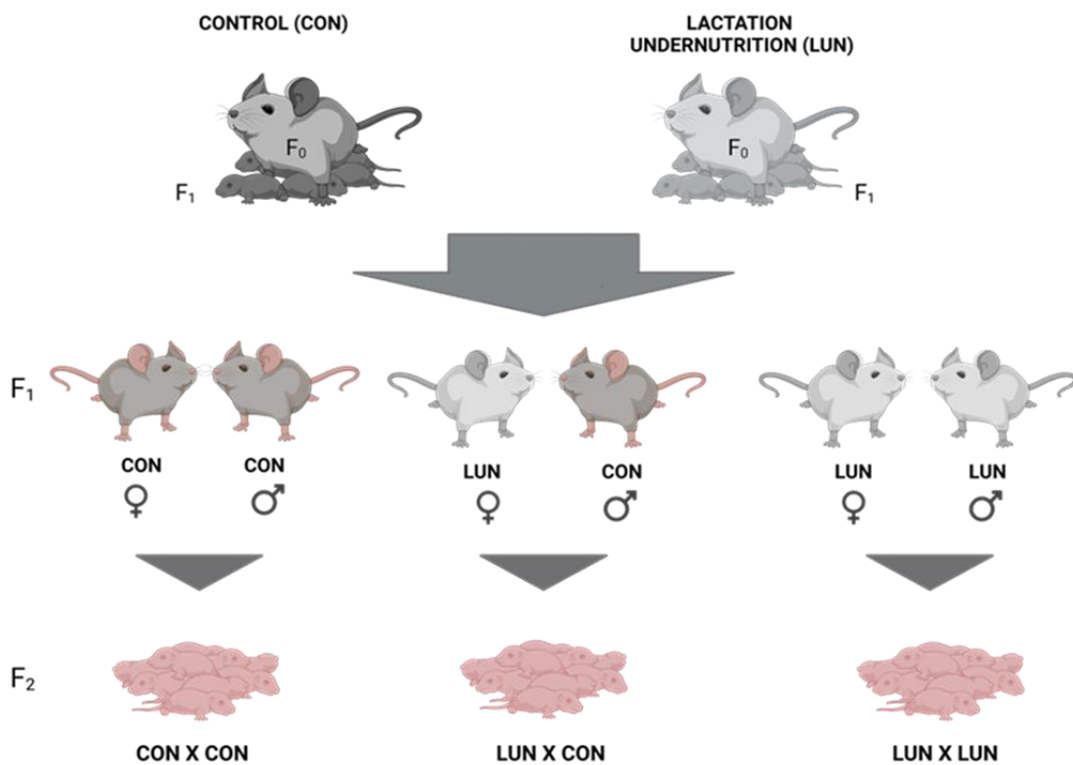
Ryc. 3.1 Protokół kojarzenia myszy w celu uzyskania osobników z ekspresją białka fluorescencyjnego tdTomato w neuronach kisspeptynowych. Myszy transgeniczne, u których rekombinaza Cre ekspresowana jest w neuronach produkujących kisspeptynę, skrzyżowano ze szczepem reporterowym zawierającym sekwencję kodującą białko tdTomato, poprzedzoną kasetą STOP oflankowaną sekwencjami *loxP*. W wyniku rekombinacji zależnej od Cre dochodzi do usunięcia kasety STOP, co umożliwia ekspresję tdTomato specyficznie w neuronach kisspeptynowych. Schemat przygotowany z wykorzystaniem narzędzia BioRender.com.

3.2.4. Protokół żywieniowy i kojarzenie myszy

Samice pokolenia F0 w wieku około 2 miesięcy kojarzono z dojrzałymi płciowo samcami. Skuteczne krycie potwierdzano na podstawie obecności śluzowego czopa w pochwie, po czym samce przenoszono do oddzielnych klatek. Podczas ciąży samice miały nieograniczony dostęp do pożywienia (karma 5LJ5 PicoLab, LabDiet, USA). W dniu narodzin (PND0, ang. *postnatal day 0*) liczebność miotów standaryzowano do 8 młodych. W drugim dniu po porodzie samice wraz z potomstwem (pokolenie F1) losowo przydzielano do dwóch grup: 1) kontrolnej (CON), w której matki karmione były *ad libitum* w okresie laktacji, oraz 2) niedożywionej (LUN, ang. *lactation undernutrition*), w której samice otrzymywały 50% dziennej porcji karmy spożywanej przez samice kontrolne. Młode odsadzano od matek w 21 dniu życia (PND21, ang. *postnatal day 21*), po czym miały nieograniczony dostęp do standardowej karmy laboratoryjnej (5053 PicoLab, LabDiet, USA). Samice (♀) i samce (♂) pokolenia F1 w wieku około 2 miesięcy kojarzono w następujących kombinacjach: CON♀ x CON♂ (CC); LUN♀ x CON♂ (LC) oraz LUN♀ x LUN♂ (LL), w celu uzyskania pokolenia F2. Samice F1 podczas laktacji oraz potomstwo F2 po odsadzeniu karmiono *ad libitum*. Protokół żywieniowy i kojarzenia myszy przedstawiano odpowiednio na rycinach 3.2 i 3.3.



Ryc. 3.2 Protokół żywieniowy. Samice z grupy kontrolnej (F0 CON) były karmione *ad libitum* przez cały okres laktacji. W grupie niedożywionej (F0 LUN) samice otrzymywały 50% dziennej porcji karmy spożywanej przez samice z grupy CON. Po odstawieniu od matki w 21 dniu życia (PND21, ang. *postnatal day 21*) potomstwo (F1) miało nieograniczony dostęp do pożywienia. Schemat przygotowano z wykorzystaniem narzędzia BioRender.com.



Ryc. 3.3 Schemat kojarzenia myszy. Samice i samce pokolenia F1, wywodzące się z grupy CON i LUN, były łączone w pary by uzyskać potomstwo F2, które nie było narażone na stres żywieniowy. Wykorzystano trzy kombinacje podczas krzyżowań: CON♀ × CON♂, LUN♀ × CON♂ oraz LUN♀ × LUN♂, co pozwoliło wyodrębnić trzy grupy eksperymentalne dla pokolenia F2: CC, LC oraz LL. Schemat przygotowano z wykorzystaniem narzędzia BioRender.com.

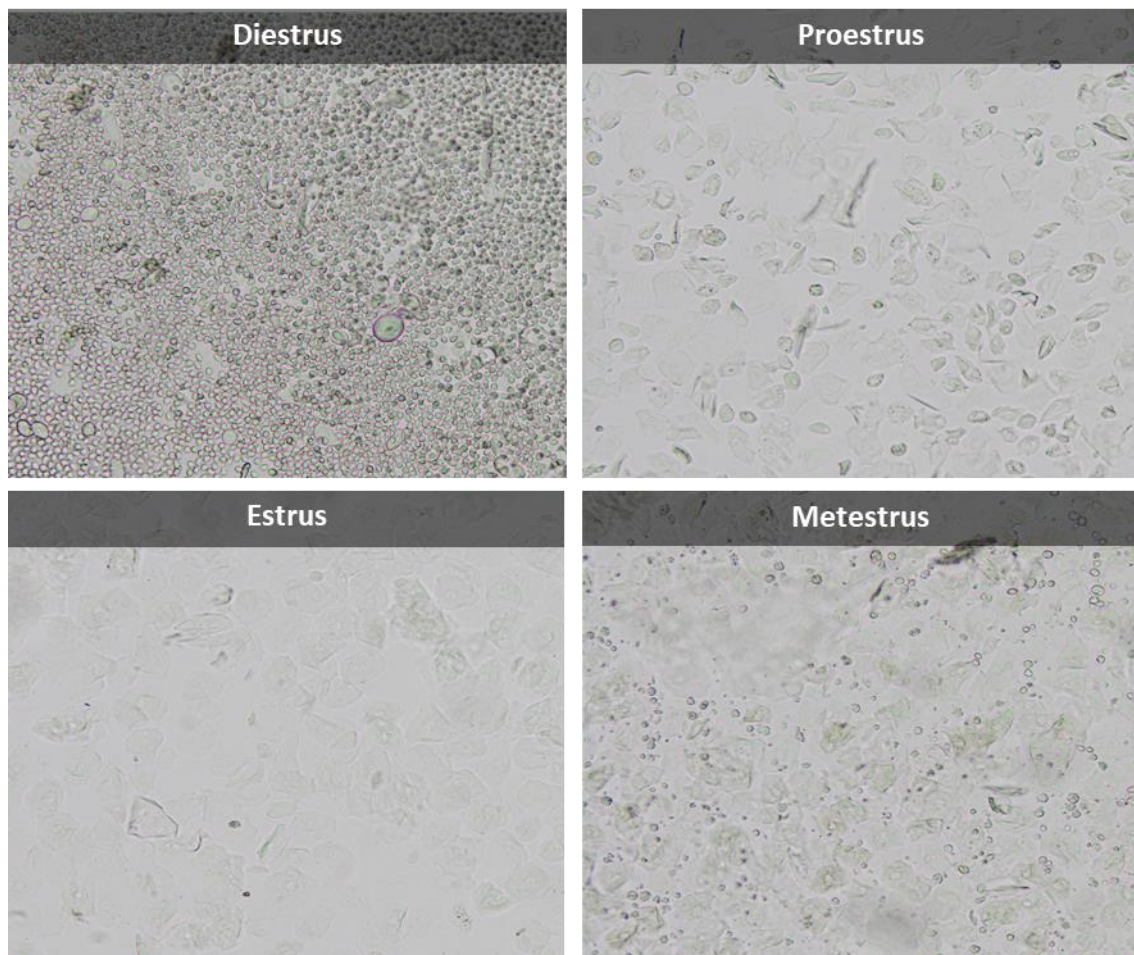
3.3. Obserwacje przyżyciowe

3.3.1. Ocena masy i składu ciała

Od dnia odsadzenia aż do ukończenia 10 tygodnia życia samice co tydzień ważono na wadze laboratoryjnej, a skład ciała, na trzech różnych etapach rozwoju płciowego, analizowano za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (Minispec LF90II).

3.3.2. Ocena dojrzałości płciowej oraz cyklu rujowego

Od 23 dnia życia u samic pokoleń F1 i F2 prowadzono obserwacje w celu określenia momentu osiągnięcia dojrzałości płciowej. Po otwarciu dróg rodnych codziennie pobierano wymazy z pochwy w celu identyfikacji fazy cyklu rujowego. Do pobrania materiału używano tępo zakończonych końcówek pipety, którą umieszczano w ujściu pochwy i kilkakrotnie przepłukiwano roztworem PBS. Wymaz nanoszono na szkiełko podstawowe i oceniano pod mikroskopem Olympus BX43 wyposażonym w kamerę XC50 przy powiększeniu 10x. Faza cyklu była oceniana na podstawie zagęszczenia i rozmieszczenia trzech typów komórek obecnych w preparatach cytologicznych.



Ryc. 3.4 Obrazy preparatów cytologicznych myszy będących w poszczególnych fazach cyklu rujowego: *diestrus* (dominacja leukocytów), *proestrus* (komórki nabłonkowe z jądrami), *estrus* (rogowaciejące komórki pozbawione jąder) oraz *metestrus* (mieszana populacja leukocytów i komórek nabłonkowych). Obiektyw 10x.

3.3.3. Ocena potencjału rozrodczego samic

Samice pokoleń F1 i F2 w wieku około 3 miesięcy łączono w pary z samcami z grup CON i CC na okres 20 tygodni. Samice pokolenia F1 były parowane w następujących kombinacjach: CON♀ x CON♂ oraz LUN♀ x CON♂, natomiast samice z pokolenia F2 w kombinacjach: CC♀ x CC♂ oraz LL♀ x CC♂. W trakcie trwania eksperymentu rejestrowano liczbę miotów urodzonych przez każdą samicę oraz liczbę młodych w każdym miocie.

3.4. Pobieranie i przygotowanie tkanek do dalszych analiz

Tkanki od samic myszy szczepu C57BL/6J (typ dziki) pobierano na różnych etapach rozwoju postnatalnego, tj. w dniu odstawienia od matki (PND21) oraz na dwóch etapach rozwoju płciowego. Pierwszy z nich określono jako dzień wystąpienia fazy *diestrus* bezpośrednio po pierwszej fazie *estrus*, w której powinna zachodzić owulacja. Z uwagi na brak jednoznacznego odpowiednika tego okresu w polskiej nomenklaturze, etap ten nazwano okoloopkwitaniowym – odnoszącym się do okresu, w którym dochodzi do aktywacji osi rozrodczej. Drugi etap ustalono jako dzień, w którym zarejestrowano fazę *diestrus* po co najmniej siedmiu regularnych cyklach rujowych, i zdefiniowano go jako czas osiągnięcia pełnej dojrzałości płciowej (osiągnięcie dojrzałości płciowej i ustabilizowanie cyklu).

Tkanki od myszy Kiss^{CreROSA26}, a dokładniej mózgowie, pobierano w 8 i 21 dniu życia oraz po osiągnięciu pełnej dojrzałości płciowej.

3.4.1. Pobieranie krwi

Krew pobierano z serca, igłą o rozmiarze 23G, przy użyciu strzykawki 1 ml, po wprowadzeniu zwierzęcia w stan znieczulenia za pomocą anestetyku wziewnego - izofluranu. Wkłucie przeprowadzono tuż powyżej przepony. Pobraną krew umieszczano w probówce z tzw. stabilizatorem (skład opisano w tabeli 3.2), a następnie wirowano przez 10 minut z prędkością 2500 RCF w temp. 4°C. Zebrane osocze przechowywano w temp. -20°C do momentu wykonania oznaczeń poziomu hormonów.

3.4.2. Pobieranie narządów przeznaczonych do izolacji kwasów nukleinowych

Po pobraniu krwi niezwłocznie dokonywano dyslokacji odcinka szyjnego zwierzęcia. Rozcinano powłoki ciała, a następnie preparowano narządy, w tym jajniki oraz podwzgórze. Narządy umieszczano w próbkach, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80°C.

3.4.3. Pobieranie narządów przeznaczonych do analiz immunohistochemicznych

Jajniki przeznaczone do analiz immunohistochemicznych umieszczano w 4% roztworze paraformaldehydu, a po 24 godzinach przenoszono do 30% roztworu sacharozy. Po opadnięciu na dno pojemnika tkankę osuszano z sacharozy za pomocą chusteczek bezpyłowych (Kimberly-Clark Professional, USA), a następnie zanurzano w medium OCT, którym wypełnione były plastikowe foremki (Thermo Fisher Scientific, USA). Dno foremki zanurzano delikatnie w izopentanie schłodzonym uprzednio w ciekłym azocie. Po przyjęciu przez OCT formy stałej, foremki umieszczano na suchym lodzie, a następnie przechowywano w temp. -80°C do czasu przygotowania preparatów do analiz immunohistochemicznych.

3.4.4. Krojenie tkanek

Bloczki z zatopionymi jajnikami montowano na głowicy kriostatu i cięto na 7 μm skrawki. Co piąty skrawek umieszczano na szkiełku podstawowym. Przygotowane preparaty przechowywano w temp. -20°C do czasu dalszych analiz.

3.4.5. Perfuzja

Po anestezji zwierzęcia ketaminą i ksylazyną uwidaczniano serce, by w lewej komorze umieścić tępo zakończoną igłę, a następnie przecinano prawy przedsionek. Za pomocą roztworu PBS z krwiobiegu wypłukiwano krew, po czym, w celu utrwalenia tkanek, wprowadzano 4% roztwór paraformaldehydu. Po zakończeniu perfuzji preparowano mózg i umieszczano na noc w 4% roztworze paraformaldehydu.

3.4.6. Przygotowanie i przechowywanie skrawków mózgowych

W celu odwodnienia tkanki utrwalony mózg umieszczano w 30% roztworze sacharozy i pozostawiano aż do opadnięcia tkanki na dno pojemnika. W następnym kroku mózg cięto na 30 μm skrawki za pomocą kriostatu. Tak przygotowaną tkankę przechowywano w roztworze do krioprotekcji tkanek na 12-dołkowej płytce w temp. -20°C .

3.5. Oznaczenie stężenia hormonów

Leptyna, androstendion, progesteron

Poziom leptyny, androstendionu i progesteronu oznaczano w osoczu krwi metodą ELISA. Oznaczenia wykonano zgodnie z instrukcjami dołączonymi przez producentów zestawów wymienionych w tabeli 3.3.

LH

Stężenie LH w osoczu myszy oznaczono metodą radioimmunologiczną (RIA). W tym celu wykorzystano zestaw RIA dostarczony przez Dr A. F. Parlowa (tabela 3.3). W pierwszym etapie pomiaru jodowano antygen LH-I-8 (AFP-12066B) z zastosowaniem chloraminy T. Proces obejmował inkubację roztworu antygeny z radioaktywnym jodem ^{125}J oraz chloraminą przez około 30 s, a następnie zatrzymanie reakcji pirosiarczynem sodowym. Otrzymany ^{125}J -LH przepuszczano przez kolumnę wypełnioną żelem BIO-GEL P-60. Do oznaczeń wykorzystano radioaktywną frakcję. Izotop oczyszczono dodatkowo na kolumnie z celulozą CF-11. Radioaktywną frakcję zabezpieczono i przechowywano w temp. 4°C by wykorzystać ją w kolejnym etapie pomiaru LH.

W dniu oznaczeń przygotowano krzywą standardową LH (0,39 ng/mL – 200 ng/mL), rozcieńczając roztwór macierzysty (AFP-5306A) w buforze 0,01 M PBS zawierającym 0,1% żelatyny (PBS-gel).

W czasie pomiaru poziomu LH do probówek reakcyjnych dodawano kolejno: PBS-gel (20 μL) i próby badane (20 μL), bądź poszczególne punkty krzywej standardowej (20 μL) i osocze blankowe pozbawione hormonów (20 μL). Do każdej probówki dodawano 200 μL przeciwciała I-rzędowego (AFP-240580). Inkubację prowadzono w RT przez noc. Następnego dnia dodawano 100 μL ^{125}J -LH o aktywności 15000 cpm, a po kolejnej inkubacji (24 godziny) przeciwciała II-rzędowe (owcze anty-królicze IgG) w objętości 200 μL . Aby wytrącić kompleksy immunologiczne, po 30 minutach w temp. 4°C do każdej probówki dodawano 1 mL polietylenoglikolu (PEG, 6%). Inkubowano 1 godzinę w temp. 4°C po czym wirowano

(30 minut, 3000 RCF, 4°C). Po odrzuceniu supernatantu, osad zawierający kompleksy antygen-przeciwciała umieszczano na 1 minutę w liczniku promieniowania gamma Wizard 2470.

17-β-estradiol

Oznaczenia poziomu E2 wykonano we współpracy z prof. Susanne E. Ulbrich z ETH Zurych. W tym celu wykorzystano metodę ELISA zgodnie z wcześniej opisanym protokołem (Meyer i in., 1990), z drobnymi modyfikacjami. Przeciwciała E2/2 Pool1 oraz znacznik 17β-estradiol-6-karboxymetyloksym peroksydaza chrzanowa (E2-6-CMO-HRP) zostały udostępnione przez zespół Physiology Weihenstephan, Technische Universität München, Niemcy.

W pierwszym etapie E2 ekstrahowano metodą ciec-z-ciecz. W tym celu do 225 μl mysiego osocza dodawano 3 mL eteru metylo-tert-butylowego (MTBE) i wytrząsano przez 2 godziny w RT. W przypadku czterech prób (2 z grupy LUN oraz 2 z grupy CC), z powodu ograniczonej ilości materiału, użyto mniejszą objętość. Warto jednak zaznaczyć, że do ekstrakcji nie stosowano minimalnej objętości próbki. Dobierano ją tak, aby końcowy ekstrakt zachował wyjściową objętość lub był lekko skoncentrowany, co jest szczególnie istotne przy niskich stężeniach E2, obserwowanych przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. W przypadku próbek o ograniczonej objętości zastosowano korektę o współczynnik rozcieńczenia.

W kolejnym etapie próbki schładzano przez co najmniej 1 godzinę w temp. -60°C. Po zakończeniu inkubacji, supernatant przenoszono do świeżych szklanych fiolek i odparowywano za pomocą urządzenia Genevac EZ-2 (StepBio, Włochy). Osad ponownie zawieszano w 225 μl buforu o następującym składzie: 40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 0,15M NaCl, 0,1% BSA (pH 7,2).

Płytki 96-dołkowe przeznaczone do oznaczenia E2 pokrywano przeciwciałami (kozie anykrólicze IgG, 1 μg na dołek) i blokowano 0,1% roztworem BSA. Do każdego dołka dodawano 50 μl próby, poszczególne punkty krzywej standardowej (50 μl) lub sam bufor (50 μl). Następnie dodawano 100 μl E2-6-CMO-HRP oraz 100 μl przeciwciała (z wyjątkiem dołków kontrolnych, do których zamiast przeciwciała dodawano 100 μl buforu). Płytki inkubowano przez noc w temp. 4°C.

Następnego dnia płytki 4-krotnie płukano 0,05% roztworem Tween 80. Do każdego dołka dodawano 150 μl roztworu zawierającego 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynamę (TMB), będącej substratem dla peroksydazy i inkubowano przez 30 minut w RT. Reakcję zatrzymywano dodając 50 μl 2M H₂SO₄. Absorbancję odczytywano przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika płytek (Biotek, USA). Oznaczenia wykonywano w dwóch powtórzeniach.

3.6. Metody pracy z kwasami nukleinowymi

3.6.1. Izolacja DNA

Tkanekę przeznaczoną do genotypowania umieszczano w 180 μL buforu do trawienia (skład opisano w tabeli 3.2), po czym dodawano 20 μL proteiny K pochodzącej z zestawu QIAamp® DNA Mini Kit. W dalszych krokach stosowano się do instrukcji dołączonej do wspomnianego zestawu. Próby inkubowano w temp. 56°C przez około 3 godziny, w zależności od stopnia strawienia tkanki. Po tym czasie dodawano 200 μL buforu AL i ponownie inkubowano przez 10 minut w temp. 70°C. W kolejnym etapie dodawano 200 μL 99,8% etanolu. Całą zawartość próbki przenoszono na kolumny umieszczone w próbkach zbiorczych. Próby wirowano, płukano 500 μL buforu AW1, a następnie 500 μL buforu AW2.

W ostatnim etapie, aby wypłukać DNA, na kolumny nałożono 20 μ L wody wolnej od kwasów nukleinowych i wirowano (8000 RPM, RT, 1 minuta). Próby z wyizolowanym DNA przechowywano w temp. -20°C . Ilość oraz jakość wyizolowanego DNA oceniano za pomocą urządzenia NanoDrop 1000.

3.6.2. Izolacja RNA

Tkanki przeznaczone do analiz transkryptomycznych przenoszono do próbek wypełnionych odczynnikiem TRI Reagent i trzykrotnie homogenizowano za pomocą urządzenia Fast Prep 24 (20 s z prędkością 20 m/s). Do homogenatu dodawano odczynnik do rozdzielania faz BCP (0,1 mL BCP / 1 mL TRI Reagent), inkubowano przez 5 minut w RT po czym wirowano przez 15 minut w temp. 4°C z prędkością 12 000 RPM. Po zakończeniu wirowania górną fazę zbierano do nowej próbki i dodawano do niej 70% etanol w stosunku 1:1. Całą zawartość próbki przenoszono na kolumny umieszczone w próbkach zbiorczych. W celu oczyszczenia RNA zastosowano RNeasy® Mini Kit i w dalszych krokach stosowano się do instrukcji przygotowanej przez producenta. Próby wirowano, płukano 350 μ L buforu RW1, a następnie 500 μ L buforu RPE. W ostatnim etapie, aby wypłukać RNA, na kolumny nakładano 30 μ L wody wolnej od kwasów nukleinowych z dodatkiem inhibitora RNAz (w rozcieńczeniu 1:20) i wirowano (10 000 RPM, RT, 1 minuta). Wyizolowane RNA przechowywano w temp. -80°C . Do oceny ilości i jakości wyizolowanego RNA wykorzystano spektrofotometr NanoDrop 1000 oraz analizator mikroprzepływowy Agilent 2100 Bioanalyzer, z zastosowaniem zestawu Agilent RNA 6000 Nano, według zaleceń producenta. Odczynniki użyte podczas izolacji RNA przedstawiono w tabeli 3.7.

Tabela 3.7 . Spis odczynników użytych podczas izolacji RNA

Odczynnik	Producent
Odczynnik TRI Reagent®	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
Odczynnik do rozdzielania faz BCP	Molecular Research Center Inc., USA
Inhibitor RNAz	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA

3.6.3. Badanie ekspresji genów

Ilościową reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR, ang. *quantitative real-time PCR*) przeprowadzono za pomocą zestawu starterów i sond TaqMan™ oraz TaqMan™ RNA-to Ct1-Step Kit. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiano w tabeli 3.8. Jako matrycy użyto 10 ng RNA. Każdą reakcję przeprowadzono w dwóch powtórzeniach na płytce 384-dołkowej w urządzeniu ViiA™ 7 Real-Time PCR System. Zastosowane warunki reakcji przedstawiono w tabeli 3.9. Do każdej reakcji przygotowywano kontrolę negatywną, gdzie zastąpiono matrycowe RNA wodą wolną od kwasów nukleinowych. Tabela 3.10 zawiera wykaz sond używanych do analizy ekspresji określonych genów, ich numery referencyjne oraz nazwy kodowanych białek.

Wartości ekspresji genów zostały obliczone z uwzględnieniem wydajności reakcji w oparciu o algorytm *PCR Miner* (Zhao i in., 2005), a następnie znormalizowane względem średniej geometrycznej ekspresji genów referencyjnych (*Actb*, *Ppib*, *Hprt*) o największej stabilności, wybranych z zastosowaniem algorytmu *NormFinder* (Andersen i in., 2004). W przypadku tkanki jajnikowej myszy genami referencyjnymi były *Ppib* oraz *Hprt*. Wyniki analizy ekspresji

genów przedstawiono w jednostkach umownych (AU, ang. *arbitrary units*), odzwierciedlających względny poziom transkryptu w badanych próbkach.

Tabela 3.8. Mieszanina reakcyjna użyta do oceny ekspresji genów

Mieszanina reakcyjna		
Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
2X TaqMan RT-PCR Mix	5 µL	1X
40X TaqMan Enzyme Mix	0,25 µL	1X
20X TaqMan Gene Expression Assay	0,5 µL	1X
H ₂ O wolna od kwasów nukleinowych	1,25 µL	1X
RNA (3,33 ng/µL)	3 µL	1 ng/µL

Tabela 3.9 Warunki reakcji RT-qPCR

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Odwrotna transkrypcja	48°C	15 min	1
Wstępna denaturacja	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	45
Przylączenie starterów	60°C	1 min	

Tabela 3.10 Startery oraz sondy użyte w reakcji qRT-PCR

Symbol genu	Nazwa białka	ID zestawu / startery F, R + sondy (5' > 3')
<i>Actb</i> *	β-aktyna	Mm00607939_s1
<i>Cd36</i>	Receptor CD36	Mm00432403_m1
<i>Ces1d</i>	Karboksylesteraza 1D	Mm00474816_m1
<i>Ces1f</i>	Karboksylesteraza 1F	Mm00523518_m1
<i>Cidec</i>	Białko FSP27 (ang. <i>fat specific protein 27</i>)	Mm00617672_m1
<i>Cyp11a1</i>	Desmolaza cholesterolowa	Mm00490735_m1
<i>Cyp17a1</i>	Cytochrom P450 17A1	Mm00484040_m1
<i>Cyp19a1</i>	Aromataza cytochromu p450	Mm00484049_m1
<i>Dnmt1</i>	Metylotransferaza DNA 1	Mm01151054_m1

<i>Dnmt3a</i>	Metylotransferaza DNA 3A	Mm00432881_m1
<i>Dnmt3b</i>	Metylotransferaza DNA 3B	Mm01240113_m1
<i>Esr1</i>	Receptor estrogenowy α	Mm00433149_m1
<i>Fshr</i>	Receptor hormonu folikulotropowego	Mm00442819_m1
<i>Hprt*</i>	Hipoksantyno-guaninofosforybozylotransferaza	Mm0446968_m1
<i>Hsd3b1</i>	Dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowa	Mm01261921_mH
<i>Hsd17b</i>	Dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa	Mm00515131_m1
<i>Inha</i>	Inhibina, podjednostka α	Mm00439683_m1
<i>Inhba</i>	Inhibina, podjednostka β A	Mm00434338_m1
<i>Inhbb</i>	Inhibina, podjednostka β B	Mm03023992_m1
<i>Lhcgr</i>	Receptor hormonu luteinizującego	Mm00442931_m1
<i>Nr1h3</i>	Receptor LXR α (ang. <i>liver X receptor alpha</i>)	Mm00443451_m1
<i>Ppib*</i>	Cyklofilina B	SF: GGTGGAGAGCACCAAGACAGA SR: GCCGGAGTCGACAATGATG
<i>Star</i>	StAR (ang. <i>steroidogenic acute regulatory protein</i>)	Mm00441558_m1

*gen referencyjny

3.6.4. Sekwencjonowanie RNA

Sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) zrealizowano przy użyciu sekwenatora NovaSeq 6000 (Illumina, USA). Biblioteki RNAseq przygotowano z wykorzystaniem zestawu TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold Human/Mouse/Rat (Illumina, USA). Analizę danych przeprowadzili dr Tomasz Molcan oraz dr Kamil Myszczyński z Laboratorium Biologii Molekularnej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Analizę danych transkryptomicznych wykonano w następujący sposób: wstępną ocenę jakości odczytów uzyskanych po sekwencjonowaniu wykonano w programie *FastQC* (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Następnie z odczytów usunięto sekwencje adapterowe oraz odczyty o niskiej jakości (Phred score < 30) wykorzystując narzędzie *cutadapt* (Martin, 2011). Uzyskane w ten sposób odczyty zmapowano do genomu referencyjnego myszy GRCm39 (baza danych *Ensembl 105*) przy pomocy programu *STAR* (Dobin i in., 2013). Zmapowane odczyty dla poszczególnych genów zostały zliczone przez program *featureCounts* (Liao i in., 2014). Analiza zróżnicowanej ekspresji genów wykonana została w programie *R* wykorzystując pakiet *DESeq2* (Love i in., 2014). Za geny

o zróżnicowanej ekspresji uznano te, dla których wartość P-adjusted < 0.05 i bezwzględna wartość krotności zmiany (|Fold Change|) ≥ 1,5 (|log2FoldChange| ≥ 0,5849625). Przy kalkulacji P-adjusted uwzględniony został współczynnik fałszywych odkryć, FDR (ang. *false discovery rate*). Zidentyfikowane geny wykorzystano do analiz funkcjonalnych. Analizy te wykonano przy pomocy pakietu *clusterProfiler* (Yu i in., 2012) wykorzystując bazę danych *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; Kanehisa i Goto, 2000), *Gene Ontology* (GO; Ashburner i in., 2000), *WikiPathways* (Kelder i in., 2012) oraz *Reactome* (Jassal i in., 2020).

3.6.5. Ustalenie genotypu zwierząt transgeniczných

Genotypowanie zwierząt zmodyfikowanych genetycznie wykonano zgodnie z protokołami udostępnionymi przez firmę The Jackson Laboratory (USA).

W celu odróżnienia myszy typu dzikiego od myszy z fuzją Cre:GFP, wstawioną w obrębie pierwszego eksonu genu *Kiss1*, przeprowadzono AS-PCR (ang. *allele specific PCR*), z zastosowaniem mieszanin reakcyjnych A i B, opisanych kolejno w tabeli 3.11 oraz 3.12. Po przygotowaniu mieszanin A i B, próbówki umieszczano w urządzeniu ProFlex™ i przeprowadzono reakcję AS-PCR w warunkach opisanych w tabeli 3.13. Sekwencje zastosowanych starterów przedstawiono w tabeli 3.14.

Tabela 3.11 Mieszanina reakcyjna A AS-PCR - identyfikacja myszy z sekwencją kodującą białko fuzyjne Cre:GFP

Mieszanina A		
Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
Bufor KAPA 2G HS	6,25 µL	1,3X
25 mM MgCl ₂	2,6 µL	2.60 mM
10 mM dNTPS-KAPA	0,65 µL	0,26 mM
10 µM common Kiss primer	1,25 µL	0,5 µM
10 µM KISS WT primer	1,25 µL	0,5 µM
Glicerol	1,625 µL	6,5 %
5 U/µL Polimeraza KAPA 2G HS taq	0,15 µl	0,03U/µL
H ₂ O wolna od kwasów nukleinowych	8,22 µL	-
DNA (5 ng/µL)	3 µL	0,6 ng/µL

Tabela 3.12 Mieszanina reakcyjna B AS-PCR - identyfikacja myszy z sekwencją kodującą białko fuzyjne Cre:GFP

Mieszanina B		
Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
Bufor KAPA 2G HS	6,25 μ L	1,3X
25 mM MgCl ₂	2,6 μ L	2.60 mM
10 mM dNTPS-KAPA	0,65 μ L	0,26 mM
10 μ M common Kiss primer	1,25 μ L	0,5 μ M
10 μ M KISS MUT primer	1,25 μ L	0,5 μ M
Glicerol	1,625 μ L	6,5 %
5 U/ μ L Polimeraza KAPA 2G HS taq	0,15 μ l	0,03U/ μ L
H ₂ O wolna od kwasów nukleinowych	8,22 μ L	-
DNA (5 ng/ μ l)	3 μ L	0,6 ng/ μ L

Tabela 3.13 Warunki reakcji AS-PCR

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	1 min	1
Denaturacja	95°C	10 s	35
Przyłączanie starterów	59°C	10 s	
Wydlużanie	72°C	1 s	
Ostateczne wydłużanie	72°C	30 s	1
Schładzanie	4°C	∞	1

Tabela 3.14 Sekwencje starterów w reakcji AS-PCR

Nazwa startera	Sekwencja (5' > 3')	Reakcja
Common	GACCTAGGCTCTGGTGAAGTACG	A B
Wild type	AGCCTCCAGTGCTCACAGCAG	A
Mutant	CTTGCGAACCTCATCACTCGTTGC	B

W kolejnym etapie łączono ze sobą 2,5 μ L mieszaniny reakcyjnej A z 2,5 μ L mieszaniny B oraz 1 μ L buforu obciążającego. Tak przygotowane próby nakładano na 2,5% żel agarozowy z dodatkiem odczynnika Simply Safe™. w obecności buforu TBE 1X. Na pierwszy dołek zawsze nakładano marker wielkości. Tabela 3.15 prezentuje odczynniki użyte do przygotowania elektroforezy produktów AS-PCR, a tabela 3.16 zastosowane roztwory. Elektroforezę przeprowadzono pod napięciem 100 V przez 1 godzinę, po czym żel

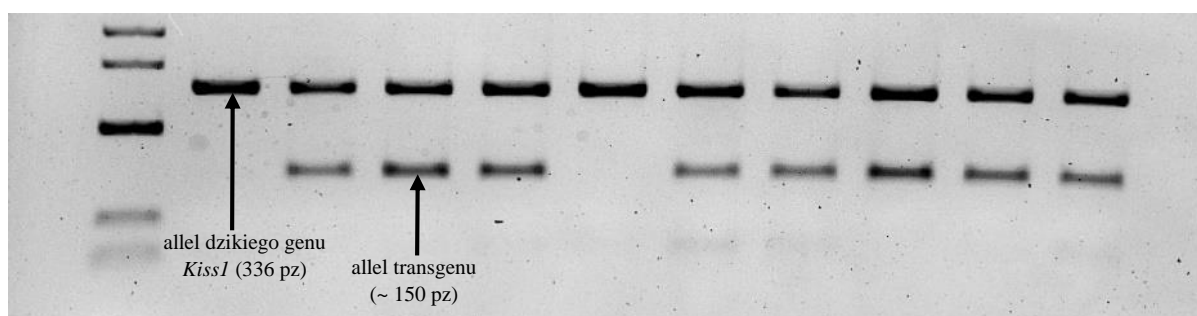
zobrazowano za pomocą urządzenia ChemiDoc™ Touch Imaging System. Rycina 3.5 przedstawia przykładowy obraz żelu umożliwiającego rozróżnienie myszy z sekwencją kodującą białko fuzyjne Cre:GFP od myszy typu dzikiego.

Tabela 3.15 Odczynniki użyte do przeprowadzenia elektroforezy produktów uzyskanych w AS-PCR

Odczynnik	Producent
Agaroza	EURX Molecular Biology Products, Polska
Barwnik kwasów nukleinowych SimplySafe™	EURX Molecular Biology Products, Polska
Bufor TBE (5X)	EURX Molecular Biology Products, Polska
Bufor obciążający	Thermo Fisher Scientific, USA
Marker wielkości 50-500 pz	EURX Molecular Biology Products, Polska

Tabela 3.16 Roztwory użyte do przeprowadzenia elektroforezy produktów uzyskanych w AS-PCR

Roztwór	Skład
Bufor TBE 1X	200 mL Buforu TBE (5X) 800 mL ddH ₂ O
Agaroza 2,5%	0,75 g agarozy 30 mL buforu TBE 1X



Ryc. 3.5 Wyniki elektroforezy w żelu agarozowym umożliwiające odróżnienie myszy z sekwencją kodującą białko fuzyjne Cre:GFP od myszy typu dzikiego. W doświadczeniach wykorzystano tkankę pobraną od heterozygot - zwierząt posiadających allel dziki genu *Kiss1* oraz transgen.

W przypadku genotypowania myszy pod kątem obecności allelu Gt(ROSA)26Sor(tdTomato-WPRE)-7914 zastosowano RT-PCR z użyciem zestawu starterów i sond TaqMan™. Skład mieszaniny reakcyjnej opisano w tabeli 3.17. PCR przeprowadzono w warunkach opisanych w tabeli 3.18 za pomocą urządzenia ViiA™ 7 Real-Time PCR System. Sekwencje zastosowanych starterów przedstawiono w tabeli 3.19. Rycina 3.6 prezentuje przykładowy wykres wygenerowany przez program QuantStudio™ Real-time PCR Software v1.7.1 (Thermo Fisher Scientific, USA), pozwalający na rozróżnienie myszy typu dzikiego od osobników noszących zmutowany allel.

Tabela 3.17 Mieszanina reakcyjna RT-PCR – wykrycie allelu Gt(ROSA)26Sor(tdTomato-WPRE)-7914

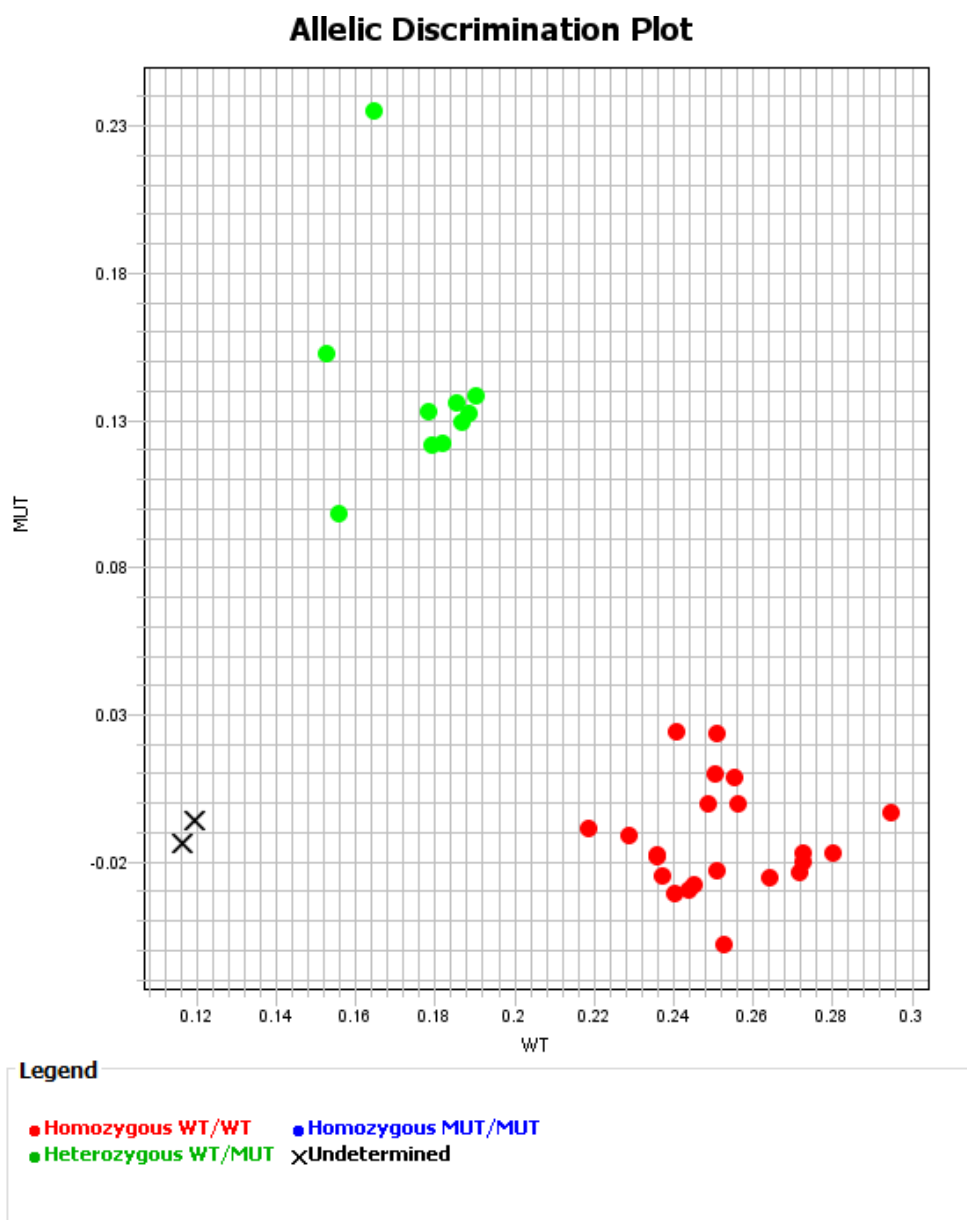
Mieszanina reakcyjna		
Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
2X KAPA Probe Fast qPCR	10 µL	1 X
10 µM ROSA F	0,8 µL	0,4 µM
10 µM Gt(ROSA)26Sor Rv	0,8 µL	0,4 µM
10 µM TG Rev	0,8 µL	0,4 µM
10 µM Mut F	0,8 µL	0,4 µM
10 µM ROSA WT Probe	0,3 µL	0,15 µM
10 µM ROSA MT Probe	0,3 µL	0,15 µM
ROX 50X low	0,4 µL	1X
H ₂ O wolna od kwasów nukleinowych	2,8 µL	-
DNA (30 ng/µl)	3 µL	(3,6 ng/µl)

Tabela 3.18 Warunki reakcji RT-PCR – wykrycie allelu Gt(ROSA)26Sor(tdTomato-WPRE)-7914

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępny odczyt	60°C	30 s	1
Wstępna denaturacja	95°C	3 min	1
Denaturacja	95°C	2 s	40
Przylączenie sond i starterów	60°C	20 s	
Odczyt końcowy	60°C	30s	1

Tabela 3.19 Sekwencje starterów – wykrycie allelu Gt(ROSA)26Sor(tdTomato-WPRE)-7914

Nazwa startera	Sekwencja (5' > 3')
ROSA F	CTGGCTTCTGAGGACCG
Gt(ROSA)26Sor Rv	AATCTGTGGGAAGTCTTGTC
TG Rev	CGATAAGCTTGATATCGAATTCCTG
Mut F	CGAGCTGTACAAGTAAGAATTGTG
ROSA WT Probe	TAACCTGGTGTGTGGGCGTTGT



Ryc. 3.6 Wykres wygenerowany w programie QuantStudio™ Real-time PCR Software v1.7.1., przedstawiający wyniki reakcji RT-PCR pozwalające na rozróżnienie myszy typu dzikiego od osobników noszących zmutowany allel (Gt(ROSA)26Sor(tdTomato-WPRE)-7914).

3.7. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

3.7.1. Procedura hybrydyzacji *in situ*

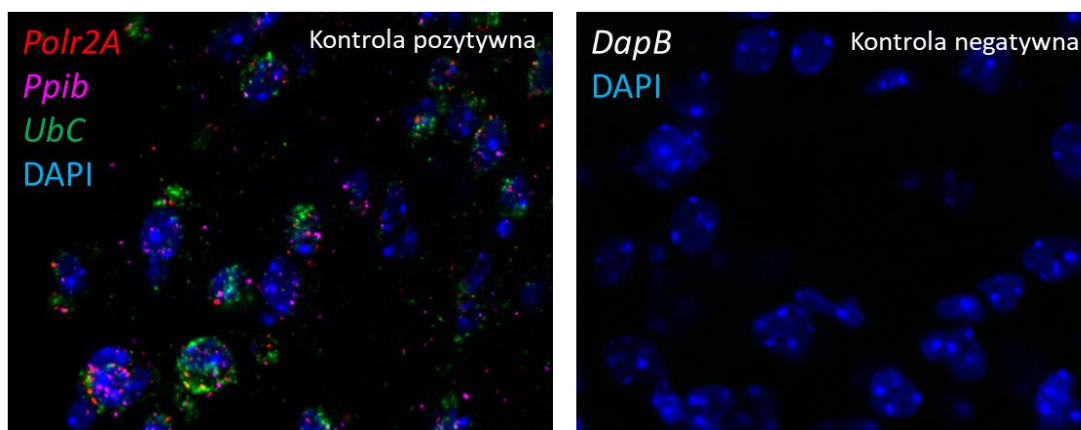
Do analizy lokalizacji transkryptów w ARC podwzgórza zastosowano metodę hybrydyzacji *in situ* – RNAscope® (ACDBio, CA, USA), opartą na tyramidowej amplifikacji sygnału. Technika ta umożliwia detekcję nawet pojedynczych cząsteczek RNA, które widoczne są jako indywidualne punkty dzięki zastosowaniu specjalnie zaprojektowanych sond. Dolna część sondy wiąże się z docelowym RNA, a górna służy jako miejsce przyłączenia preamplifikatorów, wzmacniaczy i barwników, co pozwala na precyzyjną wizualizację sygnału.

Ze względu na grubość skrawków mózgowych (30 μm) zastosowano protokół opracowany przez firmę ACDBio, CA, USA, pozwalający na nałożenie skrawków tkanki na szkiełka

podstawowe by zapewnić ich przywieranie do powierzchni. Wolnopływające skrawki mózgu, zawierające obszar ARC (bregma ~ -1,46 mm do -2,46 mm), płukano 3 x 5 minut w RT w roztworze TBST, po czym inkubowano przez 10 minut w H₂O₂, załączonym do zestawu. Następnie skrawki płukano za pomocą roztworu PBST i nakładano na szkiełka podstawowe. Tak przygotowane preparaty pozostawiano na 1 godzinę w RT do całkowitego wyschnięcia. Następnie zanurzano je w wodzie destylowanej i ponownie suszono przez 1 godzinę w RT. Po tym czasie szkiełka umieszczano w piecu do hybrydyzacji na kolejną godzinę w 60°C i ponownie zanurzano w wodzie, a następnie w 99,8% etanolu. Kolejnym krokiem było umieszczenie szkiełek na 30 minut w 60°C. Następnie na preparaty nakładano proteazę IV, będącą częścią zestawu i inkubowano przez 20 minut. Po trawieniu zastosowano standardowy protokół dla utrwalanych i zamrożonych tkanek – RNAscope™ Multiplex Fluorescent V2 Assay. W tabeli 3.20 zestawiono charakterystykę użytych sond fluorescencyjnych, natomiast rycina 3.7 przedstawia wyniki barwień kontrolnych.

Tabela 3.20 Sondy fluorescencyjne oraz przypisane im fluorochromy użyte do hybrydyzacji metodą RNAscope

Sonda	Nr kat sondy	Transkrypt	Fluorochrom	Rozcieńczenie
Mm-Lepr	402731	Receptor leptyny; mRNA	OPAL 520	1:1000
Mm-Esr1	496221-C2	Receptor estrogenowy i czynnik transkrypcyjny aktywowany przez ligand; mRNA	OPAL 650	1:1500
Mm-Kiss1	500141-C3	Metastatyna 1, kisspeptyna; mRNA	OPAL 570	1:3000
Mm-Pdyn	318771	Prodynorfina, po przetworzeniu proteolitycznym powstają z niej ligandy receptora opioidowego kappa; mRNA	OPAL 520	1:2000
Mm-Tac2	446391-C2	Tachykinina 2, neurokinina B; mRNA	OPAL 650	1:3000
Polr2A C1 - kontrola pozytywna PPIB C2 - kontrola pozytywna UBC C3 - kontrola pozytywna	320891	Polimeraza RNA typu II podjednostka RPB1 cyklofilina B ubikwityna C	C1 - OPAL 570 C2 - OPAL 650 C3 - OPAL 520	1:1500 1:3000 1:3000
DapB (C1, C2, C3) – kontrole negatywne	320871	Bakteryjna reduktaza dihydropikolinianu (<i>Bacillus subtilis</i>)	C1 - OPAL 520 C2 - OPAL 570 C3 - OPAL 650	1:1500 1:1500 1:1500



Ryc. 3.7 Hybrydyzacja *in situ* – kontrole. Po lewej widoczna ekspresja genów referencyjnych (kontrola pozytywna); po prawej brak specyficznego sygnału przy użyciu sondy do bakteryjnego genu *DapB* (kontrola negatywna).

3.7.2. Obrazowanie i analiza obrazu

Obrazowanie wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego LSM800 i immersyjnego obiektywu C-Apochromat 40×/1.2 NA. Do znakowania zastosowano barwniki Opal™ (AKOYA Biosciences, USA). Rejestrację sygnału przeprowadzono w kanałach oprogramowania ZEISS nazwanych według odpowiadających im zestawów filtrów, tj. Alexa Fluor 488/FITC (dla Opal 520), Cy3/TRITC (dla Opal 570), Alexa Fluor 647/Cy5 (dla Opal 650) oraz DAPI.

Zliczania dokonywano w regionie zainteresowania (ROI, ang. *region of interest*), obejmującym AVPV/PeN oraz ARC. Granice tych obszarów wyznaczono na podstawie atlasu mózgowia myszy autorstwa Paxinosa i Franklina (2012). W każdej próbce liczone komórki wykazujące ekspresję danego transkryptu – jako pozytywne uznawano te, w których sygnał fluorescencyjny występował w postaci przynajmniej pojedynczego punktu. Dodatkowo identyfikowano i zliczano komórki wykazujące kolokalizację transkryptów, tj. występowania sygnału fluorescencyjnego w więcej niż jednym kanale w tej samej komórce.

Zliczenia prowadzono za pomocą elementów automatycznego modułu analitycznego wchodzącego w skład oprogramowania ZEN Blue v3.11. (Carl-Zeiss, Niemcy). Analizy wykonywano przy jednakowych ustawieniach parametrów obrazowania i przetwarzania danych dla wszystkich analizowanych przypadków. Dane przedstawiano jako średnią liczbę pozytywnych komórek dla pojedynczych oraz kolokalizujących transkryptów, przypadających na badany skrawek mózgu.

3.8. Barwienia immunohistochemiczne i fluorescencyjne

3.8.1. Jajniki

3.8.1.1 Barwienie jajników

Dla uwidocznienia morfologii tkanki jajnikowej zastosowano zestaw barwiący H&E Staining Kit. Po wyjęciu z zamrażarki szkiełka ze skrawkami jajników płukano przez 3 minuty w buforze PBS, a następnie pod bieżącą wodą aż do całkowitego usunięcia OCT. Kolejnym etapem było nałożenie roztworu hematoksyliny zawartego w zestawie i inkubacja przez 20 s. Po barwieniu szkiełka opłukiwano pod bieżącą wodą przez 3 minuty, po czym наносzono odczynnik Blue Reagent na kolejne 20 s. Po tym czasie szkiełka ponownie przepłukano bieżącą

wodą, a później odwadniano je przenosząc kolejno do roztworów etanolu o stężeniu 70% i 96% (inkubacje po 30 s). Następnie aplikowano roztwór eozyny na 20 s, po czym kontynuowano proces odwadniania w 96% etanolu (2,5 minuty) oraz 99,8% etanolu (5 minut). W dalszej kolejności szkiełka traktowano dwoma roztworami substytutu ksylenu (pierwsze płukanie – 5 minut, drugie – 10 minut). Na zakończenie na skrawki nałożono medium DPX i szkiełka nakrywkowe.

3.8.1.2. Ocena morfologiczna pęcherzyków jajnikowych

Wybarwione preparaty obrazowano za pomocą skanera histologicznego Panoramic MIDI (3DHISTECH Kft., Węgry). Na każdym przekroju jajnika mierzono średnicę pęcherzyków jajnikowych z widocznym jądrem komórkowym w oocycie. Na podstawie otrzymanych wartości, a także morfologii warstw komórek ziarnistych dokonano klasyfikacji pęcherzyków: pierwszorzędowy (40-50 μm ; jedna warstwa komórek ziarnistych), drugorzędowy (80-130 μm ; dwie warstwy), wczesnoantralny (180-200 μm ; kilka warstw komórek ziarnistych, szczątkowa jama antralna) oraz antralny/przedowulacyjny (320-450 μm ; wykształcona jama antralna). W przypadku pęcherzyków, w których rozmiar nie mieścił się w zakresach dla danej kategorii, klasyfikację opierano wyłącznie na cechach morfologicznych.

Podczas analizy mierzono pole każdego skrawka (przekroju jajnika), aby oszacować przybliżoną objętość jajnika. Do pomiarów wykorzystano narzędzia zawarte w oprogramowaniu analizy preparatów histologicznych firmy 3DHISTECH Kft. (Węgry). Przybliżoną objętość (V) jajnika obliczano według wzoru: $V = 5 \cdot \sum_{i=1}^n (A_i \cdot 7 \mu\text{m})$, gdzie A_i oznacza pole przekroju jajnika na i -tym skrawku, n to liczba przeanalizowanych skrawków jajnika, $7 \mu\text{m}$ to grubość pojedynczego skrawka, a współczynnik o wartości 5 koryguje wynik, ze względu na fakt, że analizowano co piąty skrawek.

3.8.2. Tkanka mózgowa

3.8.2.1. Barwienie fluorescencyjne tkanki mózgowej

Do barwień immunofluorescencyjnych wykorzystywano skrawki mózgu obejmujące obszar AVPV/PeN (bregma $\sim +0,26 \text{ mm}$ do $-0,22 \text{ mm}$) oraz ARC ($\sim -1,46 \text{ mm}$ do $-2,46 \text{ mm}$) podwzgórza. Wszystkie płukania wykonywano w RT. Po wyciągnięciu skrawków z roztworu do krioprotekcji tkanek, płukano je 3 x 5 minut w TBS. Następnie tkankę przenoszono na płytkę 12-dołkową do 500 μL 10% roztworu surowicy (tabela 3.21) mającego zablokować miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał II-rzędowych. W każdym dołku umieszczano po 4-5 skrawków. Z tego roztworu skrawki przenoszono bezpośrednio do roztworu zawierającego przeciwciało I-rzędowe (tabela 3.21 i 3.22) i inkubowano przez całą noc w temp. 4°C na wytrząsarce kołyskowej. Podczas każdego barwienia stosowano kontrolę negatywną, gdzie nie dodawano przeciwciał I-rzędowych. W kolejnym etapie tkanki płukano 3 x 5 minut w TBS i umieszczano w roztworze z dobranym, gatunkowo zgodnym przeciwciałem II-rzędowym (tabela 3.23), następnie inkubowano przez 2 godziny w RT. Po kolejnym płukaniu dokonano barwienia jąder komórkowych za pomocą DAPI (10 $\mu\text{g/mL}$; rozcieńczony w TBS) przez 5 minut w RT. Wybarwione skrawki ponownie płukano, a następnie umieszczano na szkiełkach podstawowych, lekko osuszano, nakrapiano ProLongTM Gold Antifade Mountant i nakładano szkiełka nakrywkowe. Na rycinie 3.8 zaprezentowano przykładowe wyniki opisanego barwienia.

Tabela 3.21 Roztwory stosowane podczas barwień fluorescencyjnych tkanki mózgowej

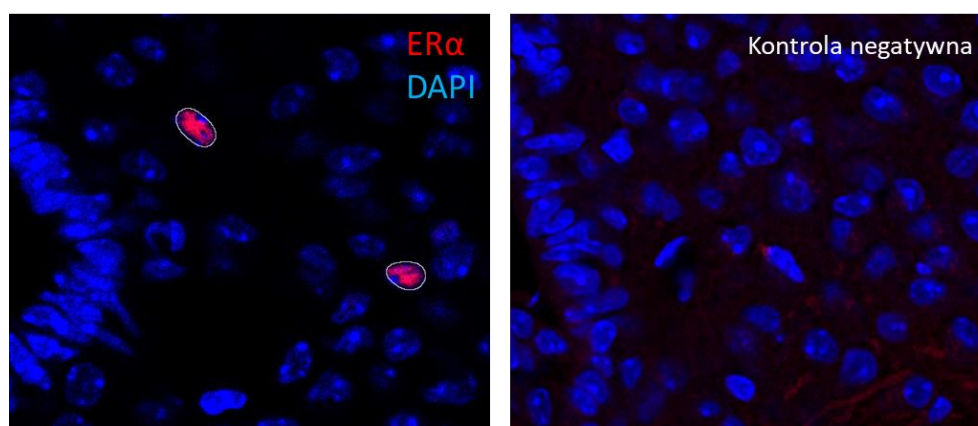
Roztwór	Skład
10 % roztwór surowicy stosowany do blokowania niespecyficznych wiązań	10% NDS 0,3% Triton X-100 TBS, pH=7,45
2% roztwór surowicy do rozcieńczania przeciwciał I-rzędowych	2% NDS 0,3% Triton X-100 TBS, pH=7,45

Tabela 3.22 Przeciwciała I-rzędowe stosowane podczas barwień tkanki mózgowej

Antygen	Gospodarz	Nr kat.	Producent	Rozcieńczenie
ER α	Królik	ab32063	Abcam, Wielka Brytania	1:1000

Tabela 3.23 Przeciwciała II-rzędowe stosowane do barwień tkanki mózgowej

Specyficzność	Gospodarz	Fluorochrom	Nr kat.	Producent	Rozcieńczenie
Królik	Osioł	Alexa 647	711-607-003	Jackson Immuno Research Labs, USA	1:500



Ryc. 3.8 ER α - immunofluorescencja. Po lewej widoczna jądrowa ekspresja ER α ; po prawej kontrola negatywna z pominięciem przeciwciał I-rzędowych.

3.8.2.2. Obrazowanie i analiza

W celu oceny ekspresji ER α w neuronach kisspeptynowych, wykonano obrazowanie przy użyciu mikroskopu konfokalnego wyposażonego w immersyjny obiektyw C-Apochromat 40 \times /1.2 NA. Sygnał fluorescencyjny rejestrowano w trzech niezależnych kanałach, odpowiadających fluorochromom: tdTomato, Alexa Fluor 647 oraz DAPI.

Podobnie jak w przypadku skrawków po hybrydyzacji *in situ*, zliczanie komórek przeprowadzono w regionie zainteresowania, obejmującym w tym przypadku ARC oraz AVPV/PeN. W każdej próbce liczono komórki wykazujące ekspresję ER α (ER α +) oraz liczbę neuronów pozytywnych dla tdTomato (tdTomato+). Komórki uznawano

za pozytywne, jeżeli sygnał fluorescencyjny był wyraźnie obecny w obrębie ciała komórki lub jądra (w przypadku ER α). Dodatkowo analizowano kolokalizację sygnałów – za komórki podwójnie pozytywne uznawano te, w których sygnał tdTomato nakładał się przestrzennie z sygnałem Alexa Fluor 647.

Zliczenia prowadzono za pomocą elementów automatycznego modułu analitycznego wchodzącego w skład oprogramowania ZEN Blue v3. 11.. Analizy wykonywano przy jednakowych ustawieniach parametrów obrazowania i przetwarzania danych dla wszystkich ocenianych zdjęć. Wyniki przedstawiano jako średnią liczbę komórek pozytywnych (tdTomato+, ER α + oraz tdTomato+/ER α +) przypadających na pojedynczy skrawek mózgu w regionie zainteresowania.

3.8.3. Fragmenty jądra łukowatego

3.8.3.1. Procedura izolacji i hodowli fragmentów jądra łukowatego

Tabela 3.24 Odczynniki użyte do przygotowania hodowli *in vitro* fragmentów ARC

Odczynnik	Producent
B27 TM suplement	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's PBS	Sigma Aldrich, USA
FBS (ang. <i>fetal bovine serum</i>)	Thermo Fisher Scientific, USA
Glukoza	Sigma Aldrich, USA
GlutaMax TM	Thermo Fisher Scientific, USA
Metyloceluloza	Sigma Aldrich, USA
Laminina	Sigma Aldrich, USA
Poli-L-lizyna	Sigma Aldrich, USA
Pożywka MEM	Thermo Fisher Scientific, USA
Pożywka Neurobasal TM - A	Thermo Fisher Scientific, USA
Roztwór penicylina-streptomycyna	Thermo Fisher Scientific, USA

Tabela 3.25 Roztwory i pożywki użyte do hodowli *in vitro* fragmentów ARC

Roztwór/pożywka	Skład
Agaroza 3%	1,5 g agarozy 50 mL ddH ₂ O
Bufor KREBS 1X	126 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,2 mM NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O 1,2 mM MgCl ₂ *6H ₂ O 2 mM CaCl ₂ 11 mM Glukoza 25 mM NaHCO ₃ ddH ₂ O
Pożywka Neurobasal A/B27	95% Neurobasal A 2% Suplement B27 1% Glukoza 1% Penicylina/streptomycyna 1% GlutaMAX (100X)
Pożywka MEM/FBS	88% MEM 10% FBS 1% Glukoza 1% Penicylina/streptomycyna
Pożywka Neurobasal A/Metyloceluloza	0,2 g Metylocelulozy 50 mL Neurobasal A
Pożywka Neurobasal A/Metyloceluloza/B27	95% Neurobasal A/Metyloceluloza 2% Suplement B27 1% Glukoza 1% Penicylina/streptomycyna 1% GlutaMAX (100X)

W pierwszym etapie przygotowano okrągłe szkiełka nakrywkowe. Szkiełka umieszczano w zlewce wypełnionej acetonem na 24 godziny w RT. Następnie płukano je kilkakrotnie 99,8% etanolem. W kolejnym kroku szkiełka opalano pojedynczo nad płomieniem palnika i umieszczano na szalce Petriego wypełnionej roztworem poli-L-lizyny (0,1 mg/mL) i pozostawiono w nim na noc w temp. 37°C. Po serii płukań sterylną ddH₂O, szkiełka pozostawiano w lodówce. W dniu eksperymentu na szkiełka nakładano lamininę rozcieńczoną 1:50 roztworem KREBS 1X i pozostawiano w inkubatorze na minimum 1 godzinę, po czym płukano pożywką Neurobasal A.

Fragmety ARC przygotowano do hodowli *in vitro*, zgodnie z wcześniej opisanymi metodami (López-Bendito i in., 2006; Decourtye i in., 2017; Decourtye i in., 2018). Mózgowie pobierano od ośmiodniowych samic Kiss^{CreROSA26}. Po wypreparowaniu, mózgi umieszczano na szklanych szalkach Petriego wypełnionych roztworem KREBS 1X, schłodzonym wcześniej w zamrażarce. Następnie tkanki umieszczano w naczyniach z 3% agarozą podgrzaną do temp. 42°C. Po zestaleniu agarozy, tkanki krojono na skrawki o grubości 300 µm przy użyciu wibratomu i inkubowano na membranach (Whatmann, Cytiva Europe GmbH, Velizy-Villacoublay, Francja) w pożywce MEM/FBS temp. 37°C i atmosferze nawilżonej z 5% CO₂ i bilansem powietrza. Po godzinie pożywkę wymieniano na Neurobasal/B27 i inkubowano przez kolejne 30 minut w tych samych warunkach. Następnie przeprowadzano dysekcję ARC.

Wycięte fragmenty inkubowano przez 30 minut w medium Neurobasal/B27, po czym umieszczano na szkiełkach nakrywkowych pokrytych lamininą w płytkach czterodołkowych wypełnionych 1 mL medium Neurobasal/Metyloceluloza/B27. Na każdym szkiełku znajdowało się od 8 do 10 fragmentów. Hodowlę wstępną prowadzono przez 24 godziny, po czym fragmenty pozostawiano w warunkach kontrolnych (świeża pożywka) lub traktowano leptyną w stężeniu 100 ng/mL przez kolejne 24 godziny.

Następnie fragmenty tkanki płukano 3 x 5 minut roztworem PBS i utrwalano w 4% PFA przez 30 minut w RT. Po utrwaleniu, szkiełka ponownie płukano, blokowano w 3% roztworze surowicy koziej (tabela 3.26) przez 45 minut i inkubowano w wybranych przeciwciałach I-rzędowych (tabela 3.27) przez noc w temp. 4°C. Następnego dnia szkiełka płukano i inkubowano przez 2 godziny w RT z przeciwciałami II-rzędowymi (tabela 3.28) skoniugowanymi z fluorochromem. Po tym czasie szkiełka ponownie przepłukiwano roztworem PBS. Gotowe szkiełka z fragmentami ARC nakładano na szkiełka podstawowe pokryte medium zamykającym (ProLong™ Gold Antifade Mountant).

Tabela 3.26 Roztwory stosowane podczas barwień fluorescencyjnych tkanki mózgowej

Roztwór	Skład
3 % roztwór surowicy stosowany do blokowania niespecyficznych wiązań	3% NGS 0,05% Tween 20 PBS, pH=7,4
1% roztwór surowicy do rozcieńczania przeciwciał I-rzędowych	2% NGS 0,05% Tween 20 PBS, pH=7,4

Tabela 3.27 Przeciwciało I-rzędowe stosowane do barwienia włókien nerwowych neuronów ARC

Antygen	Gospodarz	Nr kat.	Producent	Rozcieńczenie
Neurofilamenty	Kura	ab72998	Abcam, Wielka Brytania	1:500

Tabela 3.28 Przeciwciało II-rzędowe stosowane do barwienia włókien nerwowych neuronów jądra łukowatego

Specyficzność	Gospodarz	Fluorochrom	Nr kat.	Producent	Rozcieńczenie
Kura	Koza	Alexa 647	ab150171	Abcam, Wielka Brytania	1:400

3.8.3.2. Obrazowanie i analiza obrazu

Fragmenty ARC podwzgorza obrazowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Axio Observer Z1, wyposażonego w filtry fluorescencyjne dostosowane do fluoroforów użytych w procedurze barwienia (tdTomato, Alexa Fluor 647). Obrazy rejestrowano przy zastosowaniu immersyjnego obiektywu LD LCI Plan-Neofluar 25x/0.8 NA.

Pomiary długości aksonów przeprowadzono wykorzystując narzędzia analityczne zawarte w oprogramowaniu ZEN Blue v3.11. Ocenę morfologii projekcji neuronalnych

przeprowadzono dokonując pomiarów długości aksonów. Fragmenty ARC dzielono na cztery równe ćwiartki, z których wybierano po 10 najdłuższych, wyraźnie widocznych aksonów. Gdy liczba włókien nerwowych była ograniczona – jak miało to miejsce w populacji neuronów kisspeptynowych – mierzono długość wszystkich obecnych aksonów. Pomiaru dokonywano zaznaczając ręcznie poszczególne aksony z zachowaniem stałych parametrów skalowania dla każdej próbki.

3.9. Ocena statusu metabolicznego oocytów

3.9.1. Stymulacja hormonalna samic

Aby wywołać superowulację, dojrzałym płciowo samicom, w wieku 2-3 miesięcy, pomiędzy godziną 18:00 a 18:30, podawano dootrzewnowo 7,5 UI PMSG. Po 48 godzinach dootrzewnowo wstrzykiwano 10 IU hCG (w przypadku oocytów pozyskanych do oznaczenia ilości lipidów w oocytach, aktywności mitochondriów oraz oceny wytwarzania reaktywnych form tlenu). Pozyskanie oocytów do oznaczeń liczby kopii mtDNA oraz oceny potencjału redoks, odbyło się z zastosowaniem innego protokołu stymulacji hormonalnej. Zamiast iniekcji PMSG podano hyperOVA w objętości 0,1 mL, zgodnie z zaleceniami producenta.

3.9.2. Izolacja komórek jajowych

Kolejnego dnia pomiędzy 8:00 a 8:30 stymulowane samice znieczulano za pomocą izofluranu, a następnie przerywano rdzeń kręgowy. Wyizolowane jajniki wraz z jajowodami umieszczano na szalce z medium M2, a z ampuli jajowodu uwalniano COCs. Za pomocą pipety COCs przenoszono do kropli medium z hialuronidazą (400 ug/ml), by oddzielić komórki ziarniste od oocytów. Następnie przy użyciu szklanej pipety Pasteura oocyty płukano przenosząc je do kolejnych kropli medium M2, by ostatecznie w kroplach znalazła się liczba oocytów dostosowana do poszczególnych analiz.

Tabela 3.29 Odczynniki użyte podczas izolacji komórek jajowych myszy

Odczynnik	Producent
Medium M2	Sigma Aldrich, USA
Hialuronidaza	Sigma Aldrich, USA

3.9.3. Izolacja DNA z pojedynczego oocytu

Do izolacji DNA z pojedynczego oocytu użyto kitu ARCTURUS™ PicoPure™ DNA Extraction Kit. Do próbki z proteinazą K dodano Reconstruction Buffer zawarty w zestawie i tak przygotowany roztwór pipetowano do probówek w objętości 10 µL. W probówkach umieszczono następnie pojedyncze oocyty i inkubowano temp. w 65°C przez 3 godziny, a następnie w temp. do 95°C przez 10 minut w celu inaktywacji proteinazy K. Wyizolowane DNA przechowywano w temp. -20°C.

3.9.4. Oznaczanie liczby kopii mtDNA w pojedynczym oocycie

Do oceny liczby kopii mitochondrialnego DNA w pojedynczej komórce jajowej, zastosowano Digital PCR z wykorzystaniem komercyjnego zestawu QuantStudio 3D™ Digital PCR 20K Chip Kit v2. W pierwszym kroku przygotowano mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawiono w tabeli 3.30. Do analizy wykorzystano zestaw starterów i sondę TaqMan™

(ID: Mm04225274_s1) dla regionu mitochondrialnego genu *Nd1*. Do reakcji dodawano 1 μL nierozcieńczonego eluatu DNA uzyskanego z pojedynczego oocyty (10 μL /oocyt).

Tabela 3.30 Mieszanina reakcyjna użyta do oznaczenia mtDNA

Mieszanina reakcyjna		
Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
2X Digital PCR master mix	7,25 μL	1X
20X Zestaw TaqMan™ ND1	0,725 μL	1X
H ₂ O wolna od kwasów nukleinowych	5,525 μL	-
DNA (nierozcieńczone)	1 μL	-

Po przygotowaniu mieszaniny, próbkę nanoszono na chip zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując urządzenie QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader. Chip pokrywano płynem immersyjnym, zamykano i przenoszono do termocyklera ProFlex™ w celu przeprowadzenia reakcji PCR. W tabeli 3.31 podano warunki przeprowadzonej reakcji.

Liczbę kopii mtDNA obliczano bazując na rozkładzie Poissona w oprogramowaniu QuantStudio™ 3D AnalysisSuite (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyniki przedstawiano jako liczbę kopii przypadającą na pojedynczy oocyt.

Tabela 3.31 Warunki reakcji Digital PCR

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	96	10 min	1
Hybrydyzacja i elongacja	60	2 min	39
Denaturacja	98	30 s	
Odczyt końcowy	60	2 min	1
Zakończenie reakcji	10	∞	1

3.9.5. Oznaczenie poziomu ATP

Oznaczenie poziomu ATP w oocytach przeprowadzono stosując CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Trzydzieści oocytów od każdego z osobników umieszczono w 50 μL medium M2 w 96-dółkowej płytce (Promega, USA), a następnie dodawano 50 μL odczynnika CellTiter-Glo Reagent, przygotowanego zgodnie z instrukcją producenta. Zawartość płytki mieszano przez 2 minuty, inkubowano przez 10 minut w RT w ciemności i odczytywano sygnał za pomocą czytnika płytek MyGlo™ Reagent Reader. W celu odciążenia sygnału tła stosowano dołki zawierające wyłącznie CellTiter-Glo Reagent wymieszany z medium M2 oraz dołki wypełnione samym medium M2.

Wyniki przedstawiano jako stosunek sygnału z oocytów LUN (F1) oraz LL, LC (F2) do średniego sygnału z oocytów kontrolnych (CON - F1; CC - F2) analizowanych tego samego dnia.

3.9.6. Ocena potencjału redoks

Ogólny poziom przemian metabolicznych wewnątrz oocytu badano nieinwazyjną metodą bazującą na ocenie autofluorescencji emitowanej przez NAD(P)H oraz FAD. Obrazowanie wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego LSM800 wyposażonego w obiektyw LD Plan-Neofluar 40×/0.6 NA, który dzięki ruchomym pryzmatom pozwala precyzyjnie dobrać zakres długości fali odczytywanego sygnału. Zredukowane nukleotydy NADH i NAD(P)H zostały wzbudzone za pomocą lasera o długości fali 405 nm, a emisję odczytywano za pomocą filtra przepuszczającego w zakresie 435-485 nm. Autofluorescencję FAD odczytywano w zakresie 505-550 nm po wzbudzeniu laserem o długości fali 488 nm.

Do pomiaru średniej intensywności fluorescencji zastosowano oprogramowanie ZEN Blue v3.11. Dla każdej komórki jajowej analizowanej indywidualnie, na podstawie obrazu fluorescencji cytoplazmatycznej, ręcznie wyznaczano obszar zainteresowania (ROI) obejmujący cały widoczny oocyt. Następnie rejestrowano sygnał fluorescencji z wyznaczonego obszaru. Wynik uśredniano na podstawie serii obrazów (tzw. *Z-stack*) obejmujących cały przekrój oocytu, aby uniknąć błędów wynikających z wykorzystania tylko jednej płaszczyzny.

Stosunek zredukowanych do utlenionych nośników elektronów odzwierciedla stan metaboliczny komórek, które w głównym stopniu polegają na fosforylacji oksydacyjnej. Jedynie NAD(P)H i FAD są naturalnie fluorescencyjnymi cząsteczkami, dlatego stosunek FAD/(FAD + NAD(P)H) może być wykorzystany do określenia stanu redoks komórki (Chance i in. 1979; Georgakoudi i Quinn 2012). Określa się go jako optyczny wskaźnik redoks (ORR, ang. *optical redox ratio*). Podczas fosforylacji oksydacyjnej autofluorescencja NADH maleje, gdy jest on utleniany do niefluorescencyjnego NAD (w kompleksie I). Natomiast autofluorescencja FAD wzrasta w wyniku utlenienia FADH₂ (w kompleksie II), co prowadzi do wyższego ORR, wskazując na zwiększoną produkcję ATP (Georgakoudi i Quinn 2012; Tani Dunning, 2022).

Autofluorescencję NAD(P)H oraz FAD mierzono po umieszczeniu oocytów w kropli medium M2 i na tej podstawie obliczano też OOR. Po 20 minutach od rozpoczęcia doświadczenia do kropli, w której zawsze znajdowało się pięć oocytów, dodawano medium M2 bądź pirogronian sodu w celu otrzymania następujących stężeń – 0,8 mM, 4 mM oraz 10 mM i ponownie dokonywano pomiaru autofluorescencji NAD(P)H i FAD.

3.9.7. Ocena potencjału błony mitochondrialnej, stresu oksydacyjnego oraz zawartości lipidów

Ocenę parametrów charakteryzujących profil metaboliczny oocytów, takich jak potencjał błony mitochondrialnej, poziom reaktywnych form tlenu (ROS) oraz zawartość lipidów neutralnych przeprowadzono we współpracy z prof. Anną Ajduk z Zakładu Embriologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Zastosowano barwienia fluorescencyjne z użyciem sond molekularnych: JC-1, CellROX™ Orange oraz BODIPY™ 493/503. Obrazowanie wszystkich próbek przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss Axiovert (Carl-Zeiss, Niemcy) wyposażonego w cyfrową kamerę AxioCam HRm. Rejestracji obrazów dokonywano przy użyciu zestawu filtrów wzbudzenia i emisji dobranych do zastosowanych

barwników. Dla wszystkich kanałów fluorescencyjnych stosowano binning 4×4 oraz jednakowe ustawienia ekspozycji w obrębie każdej serii pomiarowej. Do analizy obrazu użyto programu ImageJ (National Institutes of Health, USA) oraz ZEN Blue v3.11.

W każdym eksperymencie średnia intensywność fluorescencji w oocytach została znormalizowana względem średniej intensywności fluorescencji w oocytach kontrolnych (CON w przypadku F1 oraz CC w przypadku F2), które były pobierane tego samego dnia i obrazowane równocześnie.

3.9.7.1. Ocena potencjału błony mitochondrialnej (JC-1)

Oocyty inkubowano w 2 μ M roztworze barwnika JC-1 przez 30 minut w ciemności, w temp. 37,5°C. JC-1 gromadzi się w mitochondriach w sposób zależny od ich potencjału błonowego: w przypadku niskiego potencjału tworzy monomery emitujące zieloną fluorescencję, natomiast gdy jest on wysoki – agregaty emitujące fluorescencję czerwoną. Obrazowanie wykonano w trybie *Z-stack*, rejestrując 10 optycznych przekrojów wzdłuż osi Z, oddalonych o 5,5 μ m. Użyto filtrów wzbudzenia 450-490 nm i 538-562 nm, a emisję zbierano przy 500–550 nm (zielony kanał, 20 ms) i 570-640 nm (czerwony kanał, 30 ms). Potencjał błon mitochondrialnych określano jako stosunek intensywności czerwonej fluorescencji do zielonej, obliczany na podstawie sumarycznego sygnału zebranego ze wszystkich analizowanych przekrojów oocytu. Jako kontrolę zastosowano obrazowanie komórek bez barwnika.

3.9.7.2. Ocena stresu oksydacyjnego (CellROX™ Orange)

Stężenie ROS oceniano z użyciem sondy CellROX™ Orange, która po utlenieniu emituje intensywną pomarańczową fluorescencję. Oocyty inkubowano w 5 μ M roztworze sondy przez 30 minut w ciemności w temp. 37,5°C. Po inkubacji wykonano pojedyncze zdjęcia płaszczyzny równikowej komórek. Wzbudzenie realizowano przy długości fali 538–562 nm, a emisję rejestrowano przy 570–640 nm. Czas ekspozycji wynosił 100 ms. Poziom stresu oksydacyjnego określano na podstawie średniej intensywności fluorescencji w obrębie całej komórki jajowej. Kontrolę stanowiło obrazowanie bez zastosowania sondy.

3.9.7.3. Ocena zawartości lipidów (BODIPY™ 493/503)

Do wykrywania kropli lipidowych zastosowano barwnik BODIPY™ 493/503, który selektywnie wiąże neutralne lipidy w cytoplazmie. Oocyty inkubowano w ciemności i temp. 37,5°C przez 30 minut w roztworze barwnika o stężeniu 2 μ g/ml, po czym przemywano je w PBS i natychmiast obrazowano. Użyto filtru wzbudzenia 450-490 nm i emisji 500-550 nm. Obrazowanie wykonano w trybie *Z-stack* (10 warstw, odstęp 7 μ m), z czasem ekspozycji 50 ms. Analizowano średnią intensywność fluorescencji obliczaną na podstawie sumarycznego sygnału ze wszystkich analizowanych przekrojów oocytu. Dodatkowo, w oprogramowaniu ZEN Blue v3.11. wykonano dekowolucję obrazów w celu poprawy jakości sygnału i separacji sąsiadujących kropli lipidowych. Następnie przeprowadzono ręczne zliczanie kropli lipidowych w każdej komórce. Analizę prowadzono na wszystkich analizowanych płaszczyznach oocytu, aby uniknąć wielokrotnego zliczania tych samych struktur.

3.10. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism v10.6.1 (GraphPad Software, USA) dla co najmniej trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM) lub medianę,

w zależności od charakterystyki rozkładu danych. Normalność rozkładu oceniano z wykorzystaniem testów Shapiro–Wilka oraz Kołmogorowa–Smirnowa, natomiast jednorodność wariancji weryfikowano odpowiednimi testami dostępnymi w oprogramowaniu.

W przypadku porównań dwóch grup stosowano test t-Studenta (dla danych spełniających założenia parametryczne) lub test U Manna–Whitneya. Analizy obejmujące więcej niż dwie grupy przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) bądź testu Kruskala–Wallisa, w zależności od spełnienia założeń parametrycznych. W przypadku danych pochodzących z różnych etapów rozwoju zwierząt zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (two-way ANOVA) wraz z odpowiednimi testami *post hoc* dla porównań wielokrotnych.

Dobór testów statystycznych uzależniano od charakteru rozkładu danych oraz spełnienia założeń dotyczących homogeniczności wariancji. W przypadku mniejszych liczebności grup, przy spełnieniu założeń testu parametrycznego, wyniki dodatkowo weryfikowano za pomocą odpowiednich testów nieparametrycznych. W sytuacji rozbieżności między wynikami analiz za rozstrzygający uznawano wynik testu nieparametrycznego. Przy bardzo małych liczebnościach ($n = 3$) stosowano metody nieparametryczne.

Potencjalne wartości odstające identyfikowano z użyciem funkcji *Identify Outliers*, przy zastosowaniu obiektywnych kryteriów statystycznych dostępnych w oprogramowaniu.

Informacje o zastosowanym teście statystycznym oraz liczebności analizowanych grup (n), podano w podpisach odpowiednich rycin w rozdziale Wyniki. Wartość n odpowiadała liczbie niezależnych powtórzeń biologicznych (liczbie samic), natomiast w większości analiz dotyczących oocytów – liczbie analizowanych komórek jajowych w danej grupie. W eksperymencie z hodowlą fragmentów ARC n oznaczało liczbę miotów. Za istotne statystycznie uznawano wyniki z $p < 0,05$.

4. Wyniki

4.1. Skutki niedożywienia matki w okresie laktacji – analiza fenotypu samic w kolejnych pokoleniach

4.1.1 Masa i skład ciała

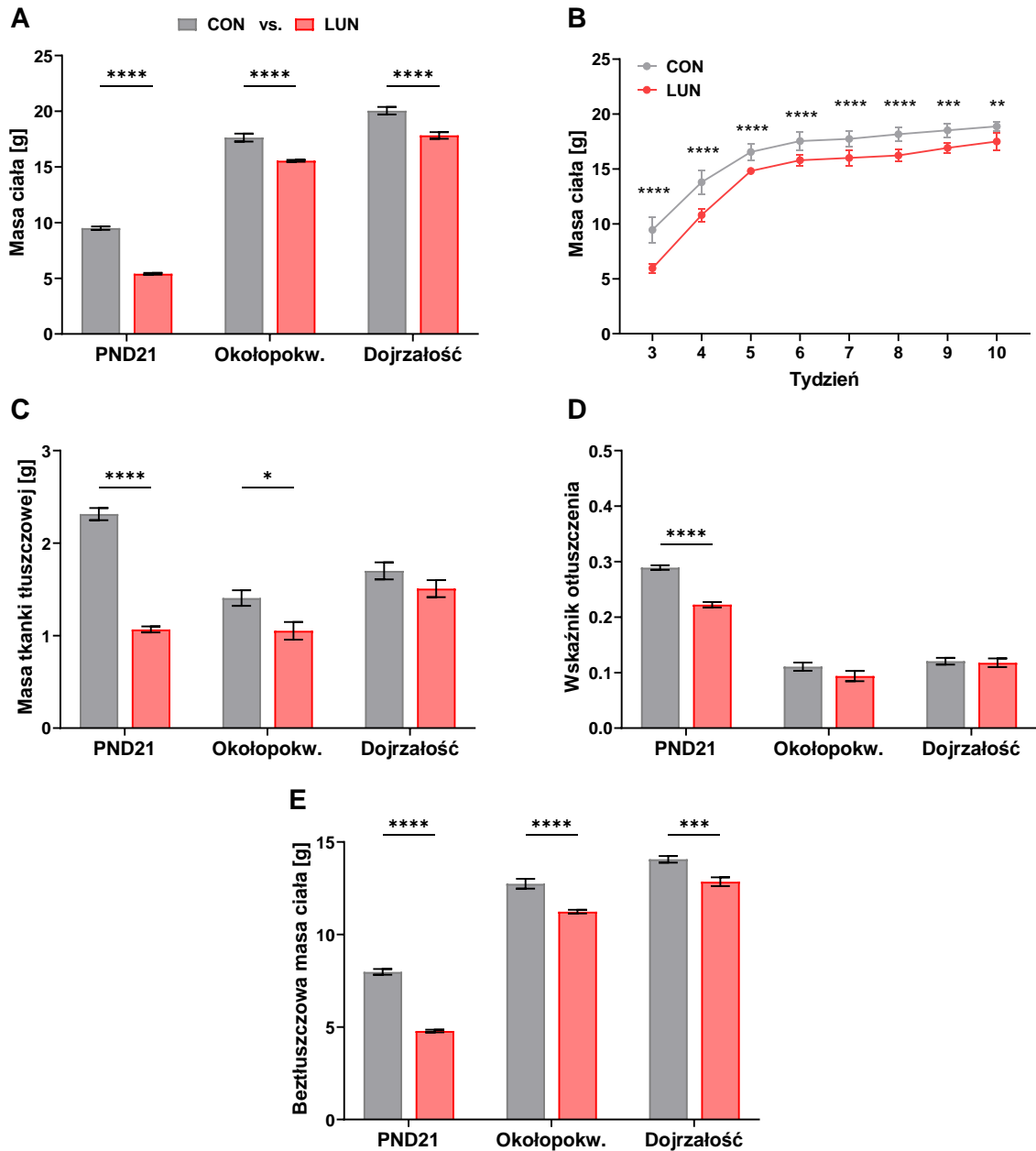
W pierwszym etapie badań postanowiono ocenić, czy niedożywienie matek podczas laktacji, wpływa na masę i skład ciała potomstwa po odstawieniu od matki. Dodatkowo analizowano, czy zaobserwowane efekty utrzymują się także w dorosłości, mimo powrotu do standardowego żywienia (*ad libitum*).

Pomiary masy ciała wykonywano co tydzień, przez pierwsze 10 tygodni życia zwierząt, począwszy od dnia odstawienia od matki. Skład ciała oceniono natomiast w trzech punktach czasowych: po zakończeniu restrykcji żywieniowej matek i odsadzeniu młodych (PND21), w okresie okołopokwitaniowym oraz po osiągnięciu pełnej dojrzałości płciowej. Z uwagi na opóźnione dojrzewanie płciowe u samic z grupy LUN, pomiary w dwóch ostatnich punktach czasowych przeprowadzono później niż w grupie kontrolnej. Zarówno wystąpienie pierwszej fazy *estrus*, a tym samym osiągnięcie okresu okołopokwitaniowego i pełnej dojrzałości płciowej były przesunięte w czasie u samic LUN średnio o 6 dni w porównaniu do grupy CON. Tę różnicę uwzględniono, aby zminimalizować wpływ zmienności wynikającej z faz cyklu rujowego, zwłaszcza w okresie okołopokwitaniowym. Ponadto, samice myszy osiągają dojrzałość płciową w różnym tempie, dlatego wybór ściśle określonego punktu czasowego nie był możliwy – skutkowałoby to dużą zmiennością w poziomach hormonów płciowych i fizjologii procesów rozrodczych. Pomiary składu ciała wykonywano w tej samej fazie cyklu rujowego – *diestrus*.

Różnice w masie i składzie ciała między grupami CON i LUN obserwowano na każdym z analizowanych etapów (Ryc. 4.1). Samice LUN cechowały się istotnie niższą masą ciała względem grupy CON ($p < 0,0001$; Ryc. 4.1 – A). Było to wyraźnie widocznie w dniu odstawienia od matki, gdy samice LUN były prawie dwukrotnie lżejsze od samic z grupy CON. Krzywa wzrostu masy ciała od 3 do 10 tygodnia życia (Ryc. 4.1 – B) potwierdziła, że przyrost masy w grupie LUN miał podobną dynamikę jak w grupie CON, ale różnice pomiędzy nimi utrzymywały się przez cały okres obserwacji (tygodnie 1–8: $p < 0,0001$; tydzień 9: $p < 0,001$; tydzień 10: $p < 0,01$). Niedożywienie matki znacząco wpłynęło również na masę tkanki tłuszczowej jej potomstwa, szczególnie w PND21 ($p < 0,0001$) i w okresie okołopokwitaniowym ($p = 0,037$; Ryc. 4.1 – C). U samic LUN masa tkanki tłuszczowej była niższa niż w grupie CON. Wskaźnik otłuszczenia (stosunek masy tkanki tłuszczowej do beztłuszczowej masy ciała) był niższy tylko w PND21 ($p < 0,0001$), natomiast na późniejszych etapach życia nie obserwowano różnic między grupami (Ryc. 4.1 – D). Beztłuszczowa masa była niższa u samic z grupy LUN we wszystkich punktach czasowych ($p < 0,0001$ dla PND21 i okresu okołopokwitaniowego; $p = 0,0004$ po osiągnięciu dojrzałości; Ryc. 4.1 – E).

W celu oceny potencjalnego wielopokoleniowego wpływu stresu żywieniowego we wczesnym okresie życia pokolenia F1, w kolejnym etapie oceniono masę i skład ciała pokolenia F2. Po odstawieniu od matki F1 stwierdzono niższą masę ciała u samic z grupy LL (potomstwo rodziców F1 narażonych na stres żywieniowy) w porównaniu do grupy CC (potomstwo dwojga kontrolnych rodziców, $p = 0,0422$; Ryc. 4.2 – A). Towarzyszyła temu niższa masa tkanki

tłuszczowej ($p = 0,0047$; Ryc. 4.2 – C), co potwierdził również niższy wskaźnik otłuszczenia ($p = 0,0069$; Ryc. 4.2 – D). Warto podkreślić, że efekt ten nie występował w grupie LC (potomstwo matki LUN oraz ojca CON). W okresie okołopokwitaniowym i po osiągnięciu pełnej dojrzałości płciowej nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami w masie ciała i tkanki tłuszczowej (Ryc. 4.2 – A, C). Jednakże dojrzałe samice LL miały niższą beztłuszczową masę w porównaniu do samic CC ($p = 0,0299$; Ryc. 4.2 – E).



Ryc. 4.1 Wpływ niedożywienia matki doświadczonego podczas okresu laktacji na: (A) masę ciała, (B) dynamikę przyrostu masy ciała do 10 tygodnia życia, (C) masę tkanki tłuszczowej, (D) wskaźnik otluszczenia (masa tkanki tłuszczowej/beztłuszczową masę ciała) oraz (E) beztłuszczową masę ciała u potomstwa (pokolenie F1) na różnych etapach życia. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono różnice między grupami w tym samym okresie życia (panel B: w każdym punkcie czasowym test t-Studenta; pozostałe panele: dwuczynnikowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Šidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Liczebność grup (n):

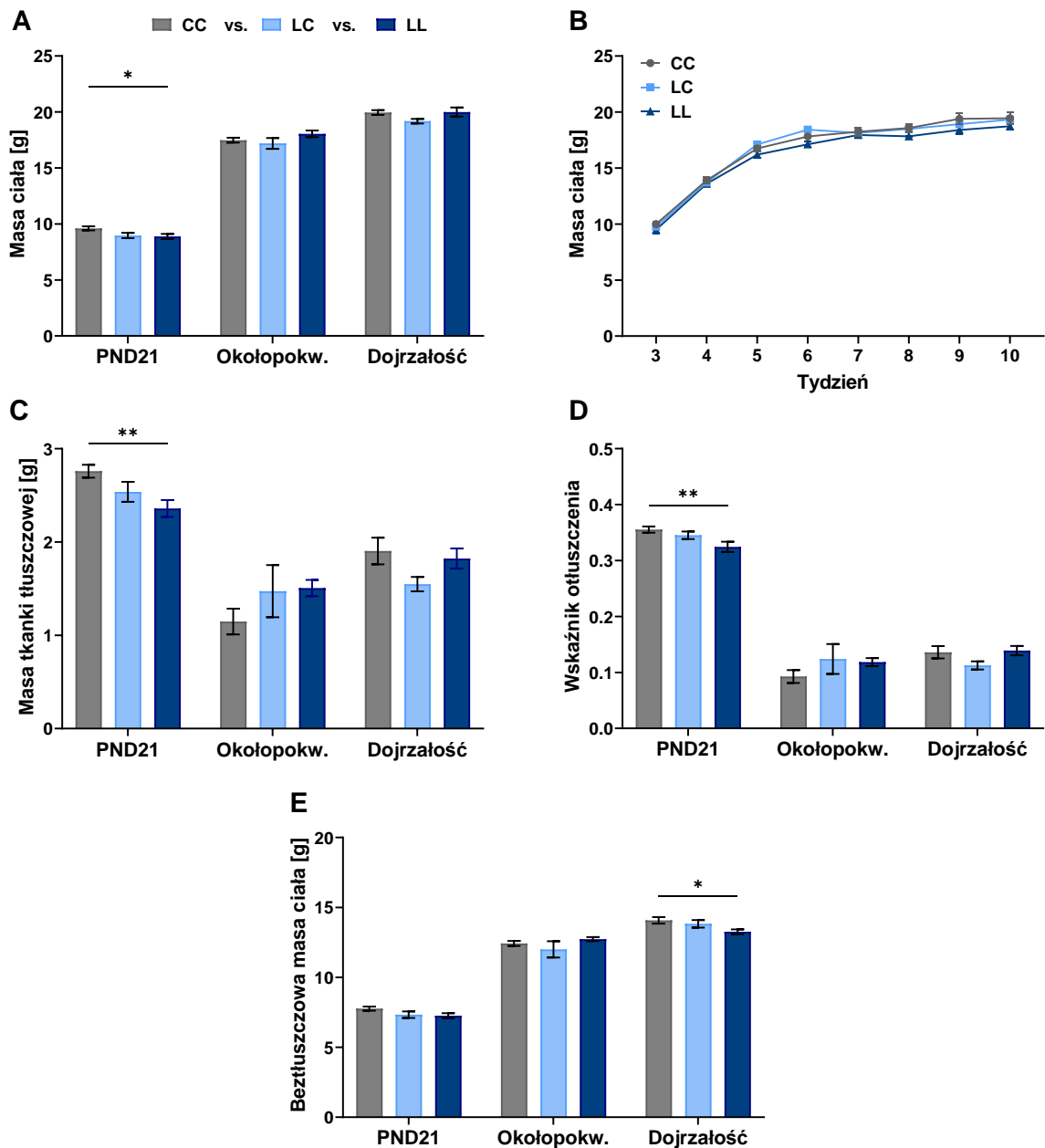
Masa ciała PND21: CON = 37, LUN = 44

Masa tkanki tłuszczowej, wskaźnik otluszczenia, beztłuszczowa masa ciała PND21: CON = 21, LUN = 27

Przyrost masy ciała w czasie: CON = 7, LUN = 8

Okres okołopokw.: CON = 7, LUN = 5

Dojrzałość: CON = 6, LUN = 8



Ryc. 4.2 Wpływ historii odżywiania rodziców (F1) na: (A) masę ciała, (B) dynamikę przyrostu masy ciała do 10 tygodnia życia, (C) masę tkanki tłuszczowej, (D) wskaźnik otluszczenia (masa tkanki tłuszczowej/beztłuszczową masę ciała) oraz (E) beztłuszczową masę ciała ich potomstwa (pokolenie F2) na różnych etapach życia. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono różnice między grupami w tym samym okresie życia (panel B: w każdym punkcie czasowym test Kruskala-Wallis z testem *post hoc* Dunna; pozostałe panele: dwuczynnikowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnetta dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Liczebność grup (n):

PND21: CC = 16, LC = 17, LL = 15

Przyrost masy ciała w czasie: CC = 5, LC = 7, LL = 4

Okres okołopokw.: CC = 7, LC = 3, LL = 5

Dojrzałość: CC = 8, LC = 5, LL = 10

4.1.2 Dojrzewanie płciowe

W celu określenia wpływu niedożywienia matki w okresie laktacji na dojrzewanie płciowe oraz przebieg cyklu rujowego u jej żeńskiego potomstwa oceniono wiek pojawienia się pierwszych objawów pokwitania, moment rozpoczęcia regularnych cykli rujowych (cykliczności) oraz długość pojedynczych cykli.

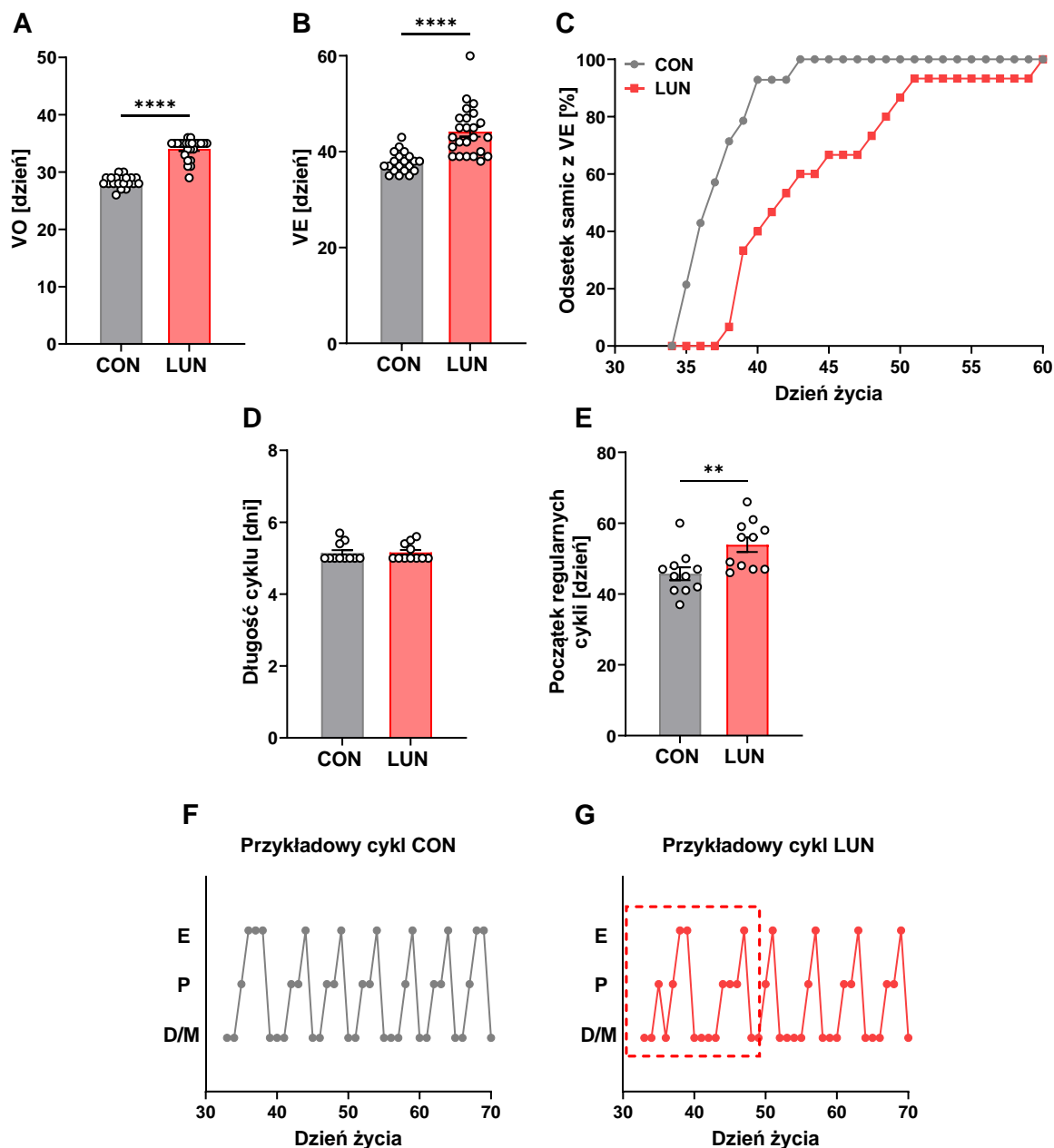
Uzyskane wyniki wskazują, że samice LUN osiągały dojrzałość płciową później niż CON. Zarówno dzień otwarcia dróg rodnych (VO, ang. *vaginal opening*), jak i wystąpienia pierwszej rui (VE, ang. *vaginal estrus*) nastąpiło później w grupie LUN ($p < 0,0001$; Ryc. 4.3 – A, B). Tak jak wspomniano wcześniej – dojrzewanie samic LUN było przesunięte w czasie średnio o około 6 dni (średni wiek osiągnięcia VO: CON = $28,35 \pm 0,22$; LUN = $34,04 \pm 0,36$ dni; średni wiek osiągnięcia VE: CON = $37,75 \pm 0,47$; LUN = $44,17 \pm 1,04$ dni).

Analiza krzywej skumulowanego odsetka samic wykazujących VE wskazuje na wyraźne opóźnienie procesu dojrzewania płciowego u samic LUN (Ryc. 4.3. – C). Przebieg tego procesu w czasie wskazuje, że u samic CON pierwsza ruja pojawiała się wcześniej i była bardziej zsynchronizowana w czasie (dni 35-43), natomiast w grupie LUN dojrzewanie samic następowało wolniej i było rozproszone w czasie (dni 38-60; Ryc. 4.3 – C).

Długość cyklu rujowego nie różniła się między grupami (Ryc. 4.3 – D). Natomiast początek występowania regularnych cykli rujowych (cykliczności), określony jako dzień wystąpienia fazy *proestrus*, rozpoczynającej pierwszy prawidłowy cykl, następował później u samic LUN ($p = 0,0075$; Ryc. 4.3 – E). Analiza przebiegu cykli rujowych ujawniła, że cykle samic CON charakteryzowały się typowym, czterofazowym przebiegiem i regularnością (Ryc. 4.3 – F). U samic LUN natomiast obserwowano opóźnienie występowania regularnych cykli rujowych oraz zaburzenia rytmu cyklu rujowego. Najczęściej występowały trudności w przechodzeniu do kolejnych faz cyklu w pierwszych tygodniach po odsadzeniu, co przejawiało się istotnym przedłużeniem trwania niektórych faz (Ryc. 4.3 – G).

W kolejnym kroku postanowiono ocenić, czy historia odżywiania rodziców wpływa na dojrzewanie płciowe i cykliczność ich żeńskiego potomstwa. VO wystąpiło później u samic LL w porównaniu do samic pochodzących od kontrolnych rodziców (CC; $p = 0,0123$; Ryc. 4.4 – A). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w wieku wystąpienia pierwszej rui między żadną z badanych grup (Ryc. 4.4 – B). Krzywa skumulowanego odsetka samic, u których odnotowano VE, wskazuje na podobny przebieg dojrzewania płciowego we wszystkich grupach, bez wyraźnego opóźnienia, które obserwowano w pokoleniu F1 (Ryc. 4.4 – C).

Nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami ani w długości pojedynczego cyklu rujowego (Ryc. 4.4 – D), ani w okresie rozpoczęcia regularnych cykli (Ryc. 4.4 – E).



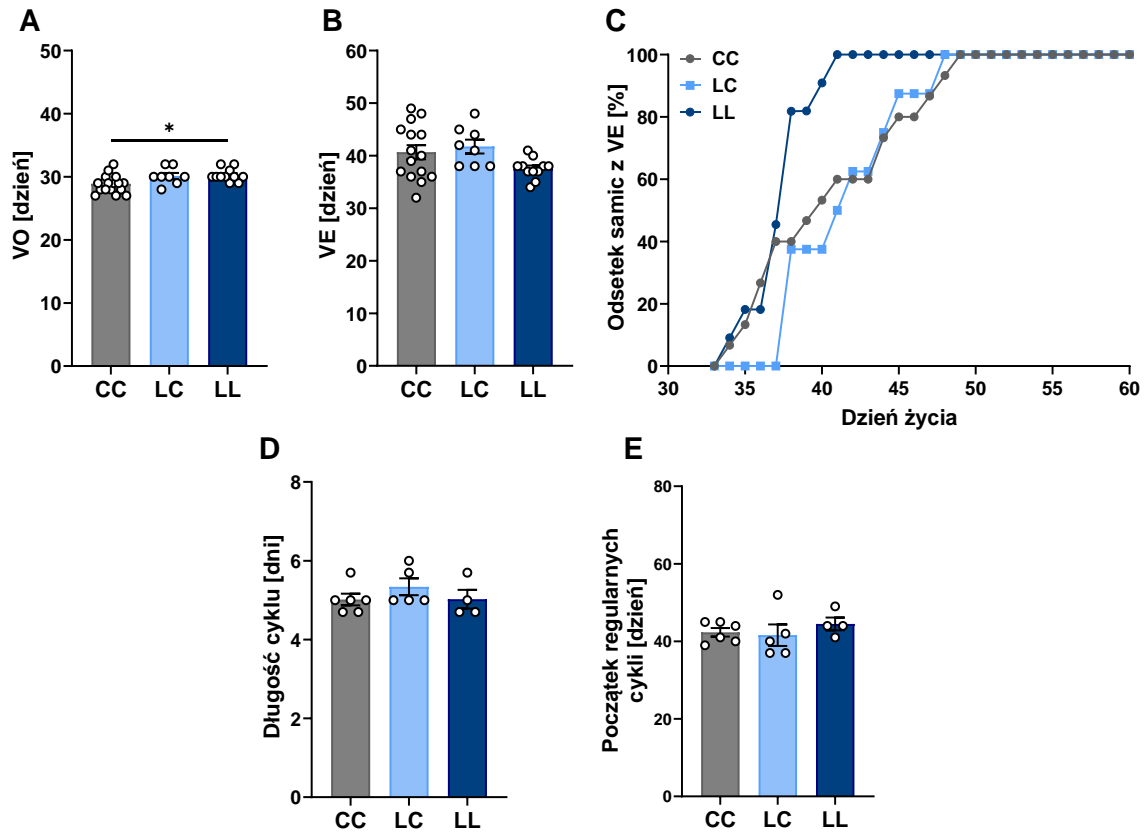
Ryc. 4.3 Konsekwencje niedożywienia matek w czasie laktacji w odniesieniu do parametrów płciowych jej potomstwa (F1). (A) Wiek wystąpienia otwarcia dróg rodnych (VO) oraz (B) wiek wystąpienia pierwszej fazy *estrus* (VE), (C) skumulowany odsetek samic z VE [%] w kolejnych dniach życia, (D) długość pojedynczego cyklu rujowego, (E) wiek rozpoczęcia regularnych cykli, (F–G) Przykładowe przebiegi cykli rujowych u samic z grupy kontrolnej (F) oraz niedożywionej (G), monitorowane na podstawie codziennej oceny cytologicznej wymazów z pochwy. E – *estrus*, P – *proestrus*, D/M – *diestrus/metestrus*. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panele A, B, E: test t-Studenta; panel D: test Manna–Whitneya; ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Liczebność grup (n):

VO, VE: CON = 20; LUN = 24

Skumulowany odsetek samic: CON = 20; LUN = 24

Długość cyklu, początek regularnych cykli: CON = 11; LUN = 11



Ryc. 4.4 Wpływ niedoborów żywieniowych doświadczonych przez rodziców we wczesnym okresie życia (pokolenie F1) na dojrzewanie płciowe oraz parametry cyklu rujowego ich żeńskiego potomstwa (pokolenie F2). (A) Wiek wystąpienia otwarcia dróg rodnych (VO), (B) wiek wystąpienia pierwszej rui (VE), (C) skumulowany odsetek samic z VE [%] w kolejnych dniach życia, (D) długość cyklu rujowego, (E) wiek rozpoczęcia regularnych cykli. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panele A, B: jednoczynnikowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnetta; panel D i E: test Kruskala-Wallisa z testem *post hoc* Dunna; * $p < 0,05$).

Liczebność grup (n):

VO, VE: CC = 18, LC = 8; LL = 11

Skumulowany odsetek samic: CC = 18, LC = 8; LL = 11

Długość cyklu, początek regularnych cykli: CC = 6; LC = 5; LL = 4

4.1.3 Potencjał rozrodczy

Ze względu na znaczne opóźnienie dojrzewania płciowego u samic LUN, w kolejnym kroku postanowiono ocenić, w jaki sposób niedobory żywieniowe we wczesnym okresie życia wpływają na ich zdolności rozrodcze. W tym celu przeprowadzono długoterminowy eksperyment, w którym samice LUN oraz CON kojarzono z kontrolnymi samcami, otrzymując pary CON♀ x CON♂ oraz LUN♀ x CON♂. Następnie przez okres 20 tygodni monitorowano liczbę ciąży oraz liczbę młodych urodzonych w każdym miocie.

Analiza liczby ciąży (Ryc. 4.5 – A) oraz średniej wielkości miotu dla każdej pary rodzicielskiej (Ryc. 4.5 – B) nie wykazała istotnych różnic między grupami. Z kolei szczegółowa analiza urodzeń (obejmująca wszystkie mioty w danej grupie bez podziału na pary rodzicielskie) wykazała, że liczebność pojedynczego miotu w grupie LUN x CON była istotnie niższa niż w grupie CON x CON ($p = 0,0118$; Ryc. 4.5 – D), choć dla całkowitej liczby młodych przypadającej na parę rodzicielską nie wykazano różnic (Ryc. 4.5 – E).

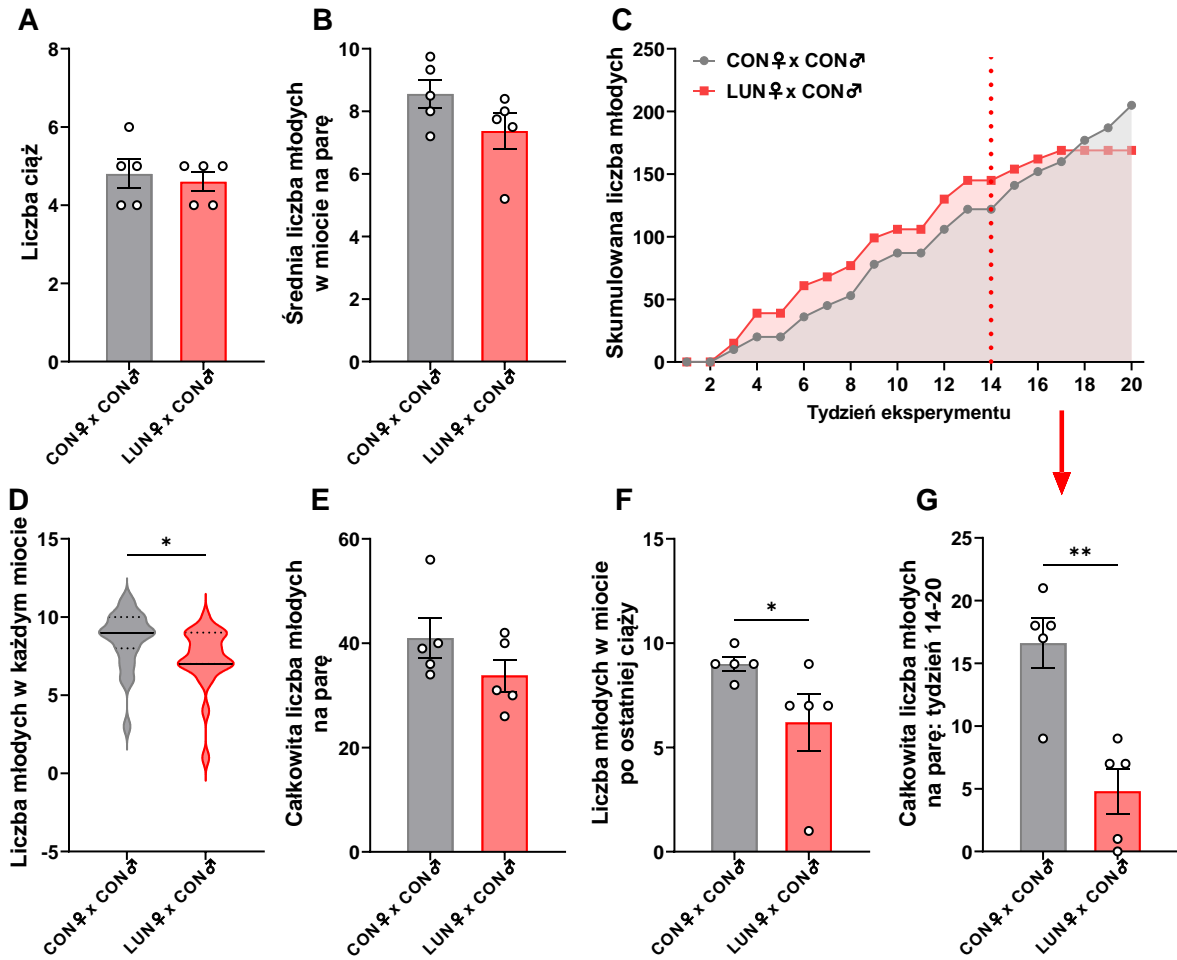
W analizie potencjału rozrodczego w czasie nie stwierdzono rozbieżności między grupami do 14 tygodnia trwania eksperymentu (Ryc. 4.5 – C). Po tym czasie zaobserwowano, że skumulowana liczba młodych nadal sukcesywnie wzrastała dla par CON♀ x CON♂, podczas gdy dla par LUN♀ x CON♂ zaczęła się wypląszczać, by osiągnąć plateau w 17 tygodniu. Istotne różnice uwidoczniły się więc w końcowej fazie eksperymentu. Liczba młodych w miocie po ostatniej ciąży była niższa u samic LUN w porównaniu do CON (Ryc. 4.5 – F; $p = 0,0397$), podobnie jak całkowita liczba młodych urodzonych przez parę LUN♀ x CON♂ w okresie między 14 a 20 tygodniem (vs. CON♀ x CON♂, $p = 0,0024$ Ryc. 5 – G).

W kolejnym etapie oceniono, czy ograniczony potencjał rozrodczy może utrzymywać się także w pokoleniu F2. Ze względu na brak wyraźnych różnic w masie ciała oraz dojrzewaniu płciowym, w tym eksperymencie pominięto grupę LC. Samice CC oraz LL kojarzono z samcami kontrolnymi (CC) i otrzymano pary CC♀ x CC♂ oraz LL♀ x CC♂. W kolejnym kroku, tak jak w pokoleniu F1, monitorowano liczbę ciąży oraz liczebność potomstwa w każdym miocie.

Nie stwierdzono istotnych różnic między grupami w liczbie ciąży (Ryc. 4.6 – A), ani w średniej liczbie młodych w miocie przypadającej na parę (Ryc. 4.6 – B). Również analiza potencjału rozrodczego w czasie nie ujawniła jednoznacznych trendów (Ryc. 4.6 – C).

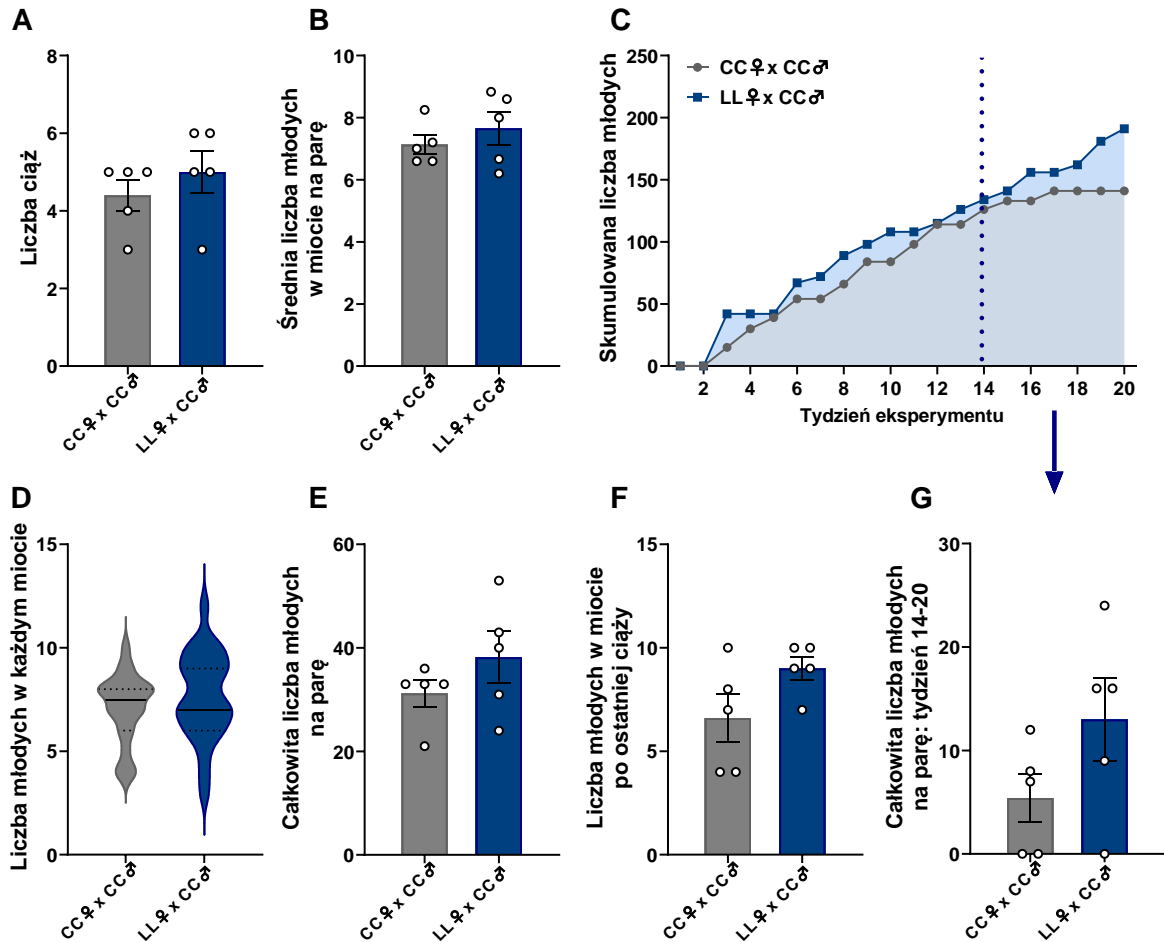
Choć średnio liczba młodych nie różniła się istotnie między grupami, rozrodczość samic LL była mniej stabilna (większa wariancja) podczas trwania eksperymentu, na co wskazuje rozkład wartości na rycinie 4.6 – D. Również całkowita liczba młodych na parę była porównywalna w obu grupach (Ryc. 4.6 – E).

Podobnie jak w przypadku pokolenia F1 prześledzono potencjał rozrodczy w końcowej fazie obserwacji (tygodnie 14–20) i nie stwierdzono różnic między grupami w wielkość miotu po ostatniej ciąży oraz w całkowitej liczbie młodych przypadających na parę (Ryc. 4.6 – F, G).



Ryc. 4.5 Wpływ niedożywienia matek w okresie laktacji na płodność ich córek (F1). (A) Liczba ciąży, (B) średnia liczba młodych na miot przypadająca na parę, (C) skumulowana liczba młodych w kolejnych tygodniach trwania eksperymentu; zaznaczono moment spadku efektywności rozrodczej w grupie LUN (strzałka). (D) Liczba młodych w każdym miocie (prezentacja rozkładu wartości), (E) całkowita liczba młodych przypadająca na parę, (F) liczba młodych w miocie po ostatniej ciąży oraz (G) całkowita liczba młodych urodzona między 14. a 20. tygodniem obserwacji. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panele B, E, G: test t-Studenta; panele A, D, F: test Manna–Whitneya; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Liczebność grup (n):
 CON♀ x CON♂ n = 5
 LUN♀ x CON♂ n = 5



Ryc. 4.6 Efekt niedożywienia samic F1 w okresie postnatalnym podczas okresu laktacji u matki na parametry rozrodcze ich potomstwa (F2): (A) liczbę ciąży, (B) średnią liczbę młodych w miocie przypadającą na parę, (C) skumulowaną liczbę młodych w kolejnych tygodniach trwania obserwacji, (D) liczbę młodych w każdym miocie (prezentacja rozkładu wartości), (E) całkowitą liczbę młodych przypadających na parę, (F) liczbę młodych w miocie po ostatniej ciąży oraz (G) całkowitą liczbę młodych urodzonych w tygodniach 14–20. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (panele B, F, G: test t-Studenta; panele A, D, E: test Manna–Whitneya).

Liczebność grup (n):

CC♀ x CC♂ n = 5

LL♀ x CC♂ n = 5

4.1.4 Profil hormonalny

Opóźnienie dojrzewania płciowego i zmniejszenie potencjału rozrodczego samic sugerują, że niedostatki żywieniowe na wczesnych etapach rozwoju prowadzą do rozregulowania osi HPG. Postanowiono więc zbadać poziom wybranych hormonów tej osi, a także leptyny, która uważana jest za kluczowy hormon przekazujący do mózgu informacje o zasobach energetycznych organizmu.

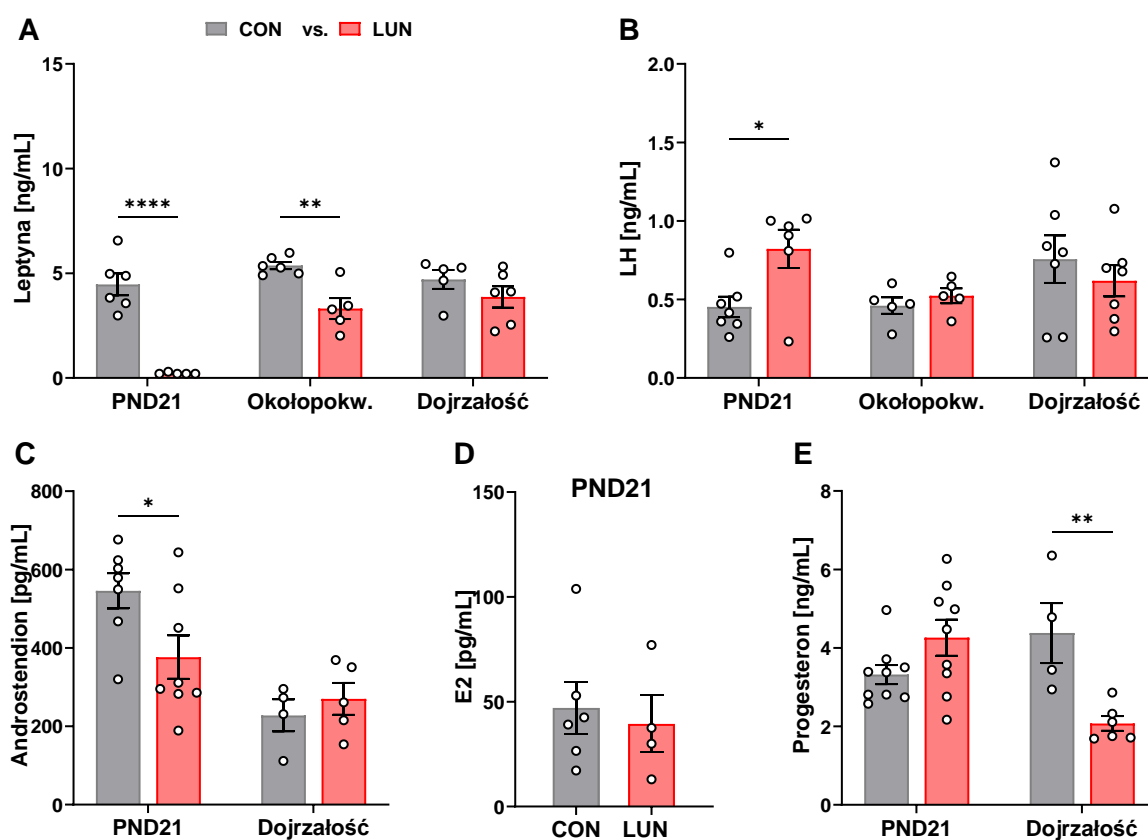
Wykazano, że poziom leptyny u samic LUN był obniżony zarówno w 21 dniu życia ($p < 0,0001$; Ryc. 4.7 – A), jak i w okresie okołopokwitaniowym ($p = 0,0055$), co odpowiada obniżonej masie tkanki tłuszczowej u tych zwierząt.

W PND21 stwierdzono również podwyższone stężenie LH u samic LUN w porównaniu do zwierząt kontrolnych ($p = 0,0478$; Ryc. 4.7 – B). Natomiast poziom androstendionu był w tej

grupie niższy ($p = 0,0316$; Ryc. 4.7 – C). Pomimo obniżonego stężenia androstendionu, który jest substratem do produkcji estrogenów, nie odnotowano różnic w poziomie E2 między grupami (Ryc. 4.7 – D).

Po osiągnięciu dojrzałości płciowej nie wykazano istotnych różnic między grupami w poziomach pozostałych hormonów, poza progesteronem, którego stężenie było niższe u samic LUN (vs. CON, $p = 0,0055$; Ryc. 4.7 – E).

Analogiczne analizy przeprowadzono u samic pokolenia F2. Większość hormonów na każdym z badanych etapów rozwoju utrzymywała się na podobnym poziomie. Co istotne, w 21 dniu życia u samic z grupy LL zaobserwowano podwyższone stężenie E2 względem grupy CC ($p = 0,0065$; Ryc. 4.8 – D).



Ryc. 4.7 Profil hormonalny samic pokolenia F1 na różnych etapach rozwoju. Stężenia: (A) leptyny, (B) LH, (C) androstendionu, (D) E2 oraz (E) progesteronu. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono różnice między protokołami żywieniowymi w tym samym okresie życia (test t-Studenta lub dwuczynnikowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Šidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Liczebność grup (n):

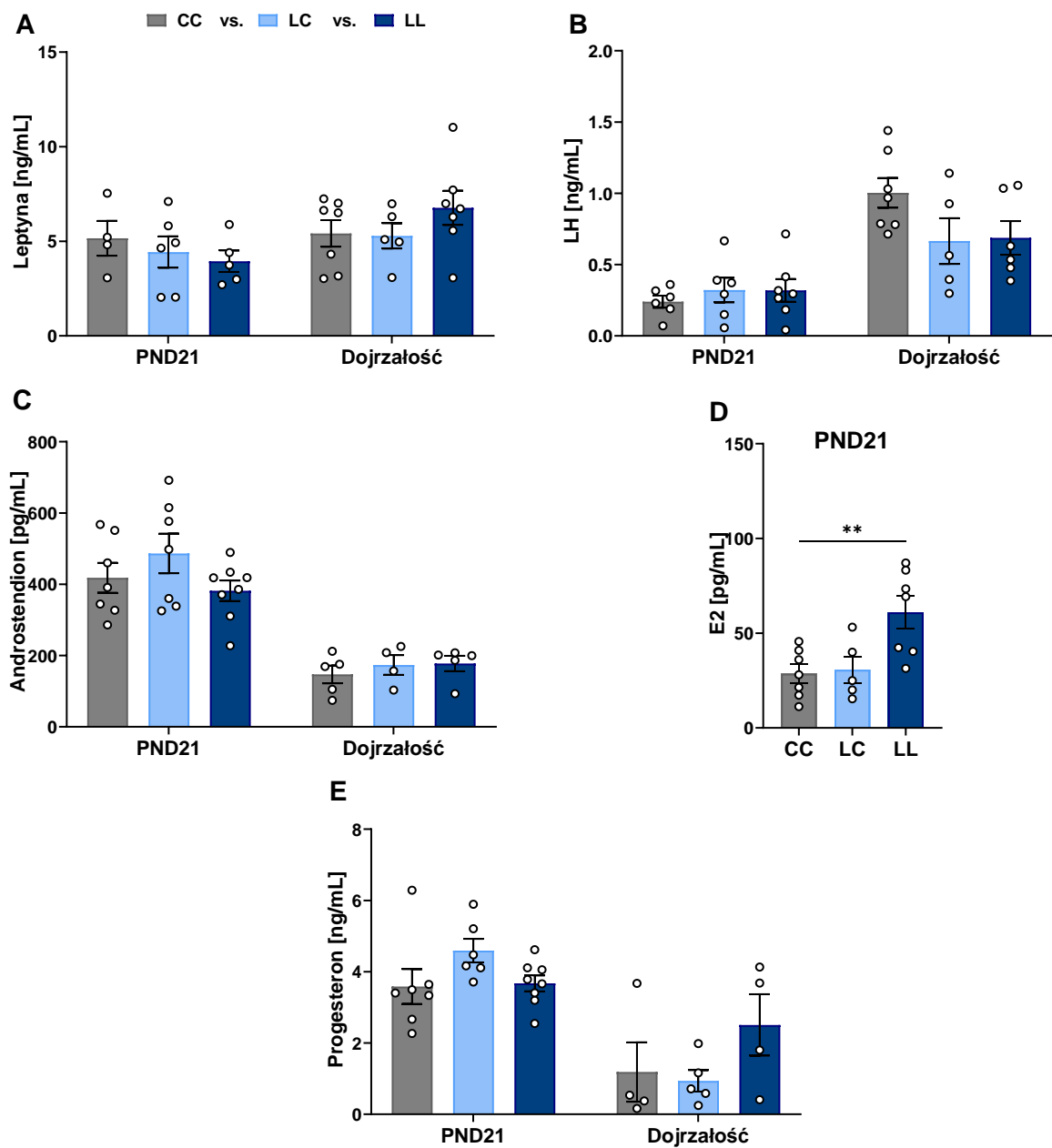
Leptyna: PND21 – CON = 6, LUN = 5; Okołopokwitaniowy – CON = 6, LUN = 5; Dojrzałość – CON = 5, LUN = 6

LH: PND21 – CON = 7, LUN = 6; Okołopokwitaniowy – CON = 5, LUN = 5; Dojrzałość – CON = 7, LUN = 7

Androstendion: PND21 – CON = 7, LUN = 8; Dojrzałość – CON = 4, LUN = 5

E2: CON = 6, LUN = 4

Progesteron: PND21 – CON = 9, LUN = 9; Dojrzałość – CON = 4, LUN = 6



Ryc. 4.8 Profil hormonalny samic pokolenia F2 na różnych etapach rozwoju. Stężenia: (A) leptyny, (B) LH, (C) androstendionu, (D) E2 oraz (E) progesteronu. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono różnice między grupami w tym samym okresie życia (jednoczynnikowa ANOVA lub dwuczynnikowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnetta dla porównań wielokrotnych; ** $p < 0,01$).

Liczebność grup (n):

Leptyna: PND21 – CC = 4, LC = 6, LL = 5; Dojrzałość – CC = 7, LC = 5, LL = 7

LH: PND21 – CC = 6, LC = 6, LL = 7; Dojrzałość – CC = 7, LC = 5, LL = 6

Androstendion: PND21 – CC = 7, LC = 7, LL = 8; Dojrzałość – CC = 5, LC = 4, LL = 5

E2: CON = 7, LC = 5, LL = 7; Progesteron: PND21 – CC = 7, LC = 6, LL = 8;

Dojrzałość – CC = 4, LC = 5, LL = 4

4.1.5 Liczba pęcherzyków jajnikowych i odpowiedź na stymulację hormonalną

Z uwagi na różnice w masie i składzie ciała, poziomach hormonów oraz opóźnienie dojrzewania płciowego u potomstwa na przestrzeni pokoleń (F1, F2) postanowiono przeprowadzić analizę morfometryczną jajników.

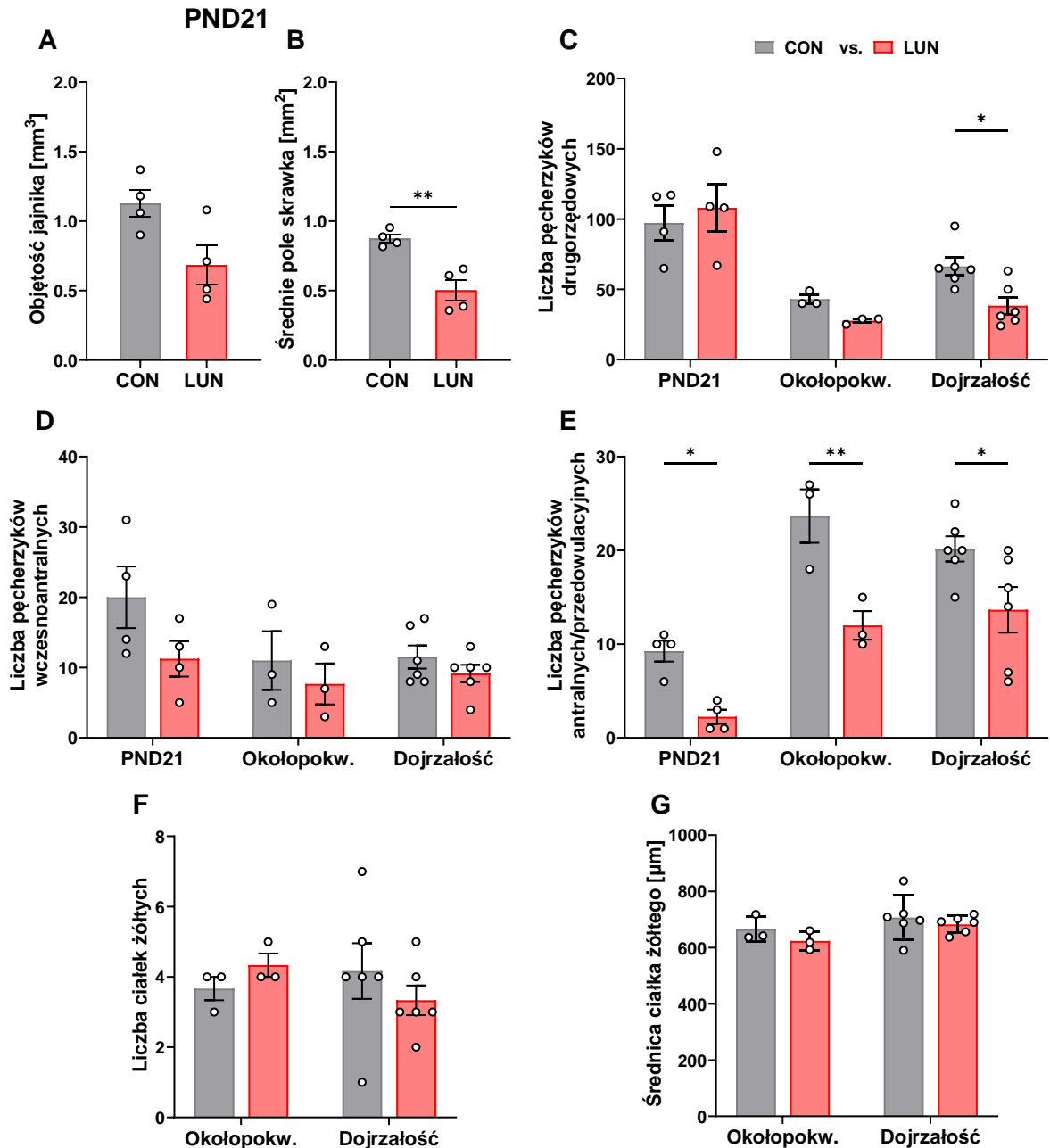
Analizę rozpoczęto od oszacowania objętości gonad na podstawie wymiarów skrawków jajników oraz obliczenia średniego pola powierzchni pojedynczych skrawków analizowanych u danego osobnika, aby ocenić, czy różnice w masie ciała w 21 dniu życia znajdują odzwierciedlenie w wielkości jajników. Wykonana analiza morfometryczna wykazała, że objętość jajników nie różniła się istotnie między grupami (Ryc. 4.9 – A). Stwierdzono natomiast istotną różnicę w średnim polu powierzchni pojedynczych skrawków, które było wyraźnie mniejsze u samic LUN niż u samic CON ($p = 0,0038$; Ryc. 4.9 – B).

W kolejnym kroku analizowano poszczególne typy pęcherzyków jajnikowych. Podczas analizy obrazu preparatów histologicznych liczono pęcherzyki drugorzędowe, wczesnoantralne oraz antralne/przedowulacyjne. Z uwagi na różnice w poziomie progesteronu u dojrzałych płciowo samic dodatkowo oceniano liczbę ciałek żółtych oraz ich średnicę. Sprawdzone również odpowiedź dorosłych osobników na stymulację hormonalną, ewidencjonując liczbę owulowanych oocytów.

Liczba pęcherzyków drugorzędowych była obniżona jedynie u w pełni dojrzałych płciowo samic LUN ($p = 0,0208$; Ryc. 4.9 – C), natomiast spadek w liczbie pęcherzyków antralnych/przedowulacyjnych odnotowano na wszystkich analizowanych etapach rozwoju ($p = 0,0217$ dla PND21, $p = 0,0018$ dla okresu okołopokwitaniowego i $p = 0,0103$ dla okresu dojrzałości; Ryc. 4.9 – E). Nie stwierdzono natomiast różnic w liczbie pęcherzyków wczesnoantralnych, liczbie ciałek żółtych ani w ich średnicy między samicami LUN a CON (Ryc. 4.9 – D, F, G).

Biorąc pod uwagę różnice odnotowane u samic F1 w 21 dniu życia, dokonano również oceny wielkości jajników oraz liczby pęcherzyków jajnikowych w pokoleniu F2 na tym samym etapie rozwoju. Z uwagi na brak różnic fenotypowych oraz hormonalnych w grupie LC, została ona pominięta w analizie morfometrycznej jajników. Nie wykazano różnic w rozmiarze jajników między samicami CC i LL (Ryc. 4.10 – A, B). Podobnie, nie odnotowano istotnych zmian w liczbie poszczególnych typów pęcherzyków jajnikowych (Ryc. 4.10 – C, D, E).

Liczba owulowanych oocytów u samic z grup CON i LUN w odpowiedzi na stymulację hormonalną w obu zastosowanych protokołach superowulacji była porównywalna (Ryc. 4.11 – A, B). Ciekawą obserwacją w pokoleniu F2 była natomiast niższa wydajność owulacji u samic LL przy zastosowaniu protokołu z PMSG + hCG ($p = 0,0135$; Ryc. 4.11 – D). Po zastosowaniu preparatu hyperOVA + hCG, który zawiera dodatkowo przeciwciała przeciwko inhibinie (znosząc jej hamujący wpływ na wydzielanie FSH i zwiększając wydajność owulacji; CON po hyperOVA vs. po PMSG: $p = 0,0002$, test t-Studenta), obserwowana wcześniej różnica nie występowała (Ryc. 4.11 – C).



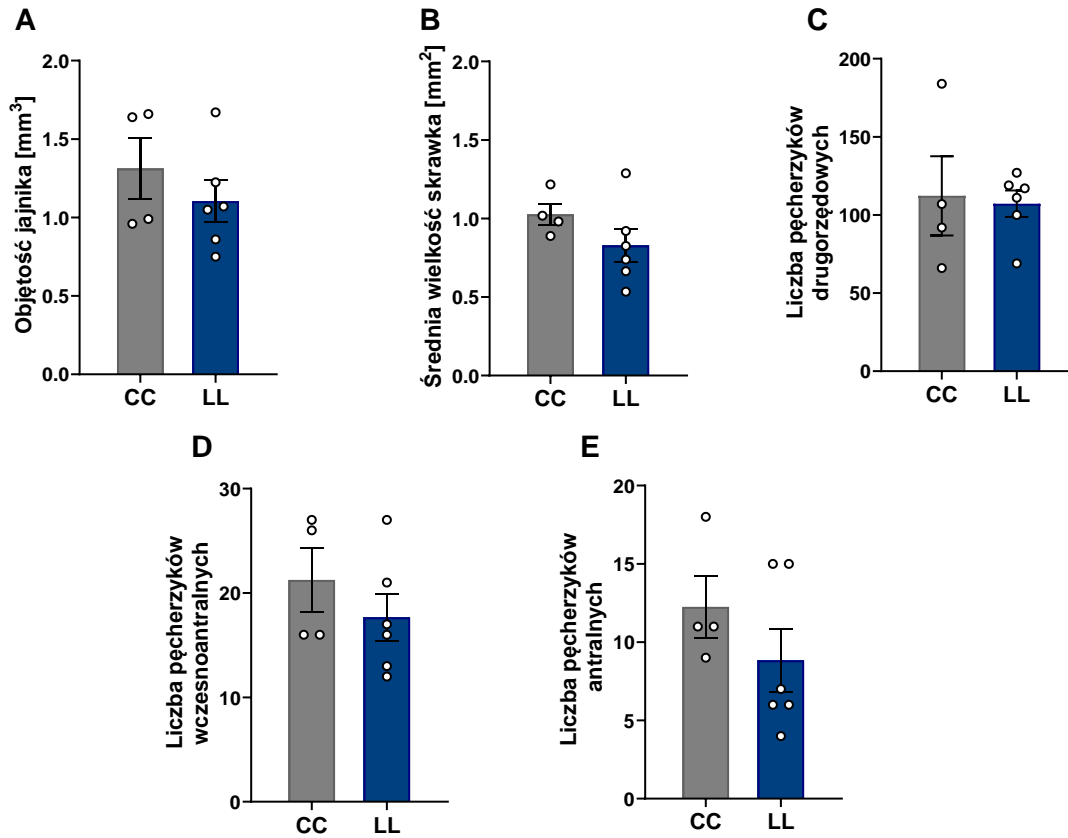
Ryc. 4.9 Analiza morfometryczna jajników samic pokolenia F1. (A) Objętość jajników, (B) średnie pole powierzchni analizowanych skrawków oraz liczba pęcherzyków jajnikowych: (C) drugorzędowych, (D) wczesnoantralnych, (E) antralnych/przedowulacyjnych. Liczba ciałek żółtych (F) oraz ich średnica (G). Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panel A: test Manna-Whitneya; panel B: test t-Studenta; panele C-G: dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Śidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Liczebność grup (n):

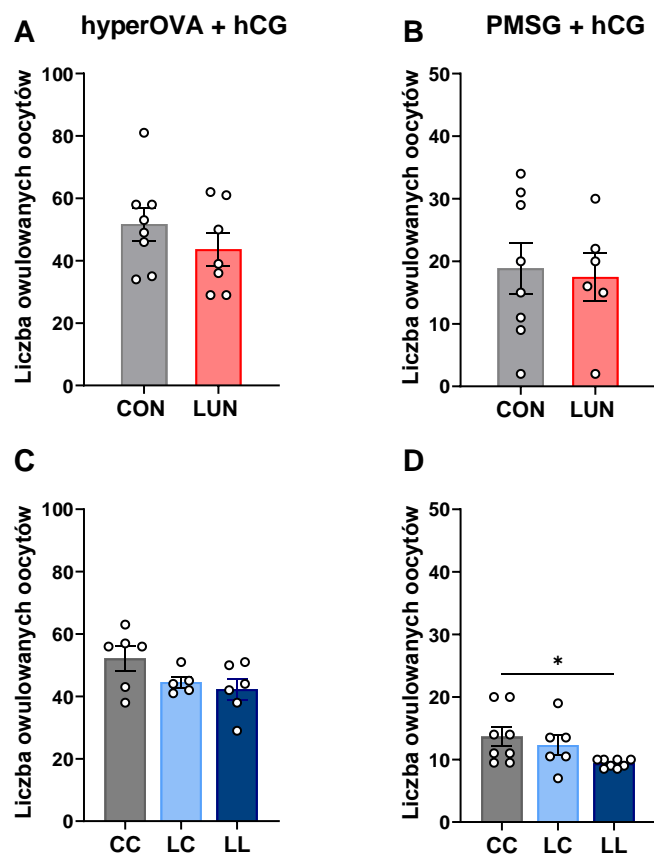
PND21: CON = 4, LUN = 4

Okres okołopokw.: CON = 3, LUN = 3

Dojrzałość: CON = 6, LUN = 6



Ryc. 4.10 Analiza morfometryczna jajników samic pokolenia F2 w 21 dniu życia (PND21). (A) Objętość jajników, (B) średnie pole powierzchni analizowanych skrawków oraz liczba pęcherzyków jajnikowych: (C) drugorzędowych, (D) wczesnoantralnych, (E) antralnych/przedowulacyjnych. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Brak różnic między grupami (panele B, C, D: test t-Studenta; panele A i E: test Manna-Whitneya). Liczebność grup (n): PND21: CC = 4, LL = 6



Ryc. 4.11 Wpływ niedożywienia samic podczas laktacji na liczbę owulowanych oocytów po stymulacji hormonalnej jej żeńskiego potomstwa przy użyciu (A) hyperOVA + hCG lub (B) PMSG + hCG. Analiza tych samych parametrów została wykonana także w kolejnym pokoleniu myszy (F2) po stymulacji (C) hyperOVA + hCG lub (D) PMSG + hCG. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panel A i B: test t-Studenta; panel C: jednoczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Dunnetta; panel D: test Kruskala-Wallis z testem *post hoc* Dunna; * $p < 0,05$).

Liczebność grup (n):

hyperOVA + hCG: CON = 8, LUN = 7; CC = 6; LC = 5; LL = 6

PMSG + hCG: CON = 8, LUN = 6; CC = 8; LC = 6; LL = 8

4.2 Wpływ niedoborów żywieniowych we wczesnym okresie życia na transkryptom jajnika w ujęciu wielopokoleniowym

W celu zidentyfikowania molekularnych konsekwencji niedożywienia matki w okresie laktacji w układzie rozrodczym jej potomstwa, przeprowadzono analizę transkryptomu jajników samic pokolenia F1 (CON n = 6; LUN n = 6), które pobrano w dniu odstawienia od matki (21 dzień życia). Do analiz wykorzystano również jajniki pochodzące od samic pokolenia F2 (CC n = 5; LC n = 4; LL n = 4), które pozyskano na tym samym etapie rozwoju (PND21), co materiał z pokolenia F1.

W jajnikach samic LUN odnotowano wzrost ekspresji 619 genów i zmniejszenie ekspresji 169 genów ($-\log_{10}$ dla wartości P-adjusted $< 0,05$ oraz $\log_2FC \geq 0,58$ lub $\log_2FC \leq -0,58$) w porównaniu do grupy CON (Ryc. 4.12).

W celu biologicznej interpretacji zidentyfikowanych genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs, ang. *differentially expressed genes*), przeprowadzono analizę nadreprezentacji genów z wykorzystaniem baz danych *Gene Ontology* (GO), *Kyoto Encyclopedia of Genes*

and Genomes (KEGG), *Reactome* oraz *WikiPathways*. Analiza danych pokolenia F1 ujawniła, że liczne DEGs (LUN vs. CON) zaangażowane są w procesy związane z metabolizmem lipidów oraz jego regulacją (Ryc. 4.13). Z kolei wśród procesów, których aktywność została osłabiona znalazły się m.in. te związane z syntezą i metabolizmem hormonów steroidowych (Ryc. 4.14). Na rycinie 4.15 przedstawiono 50 DEGs – 25 o najwyższych oraz 25 o najniższych wartościach \log_2FC .

Aby wytypować geny, które mogłyby mieć największe znaczenie w kontekście programowania żywieniowego funkcji rozrodczych w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych, w tabeli 4.1 zestawiono kategorie procesów biologicznych, w które zaangażowane były geny o najwyższych wartościach $|\log_2FC|$, ze szczególnym uwzględnieniem procesów związanych z metabolizmem i transportem tłuszczów. Pomimo że zgodnie z bazą GO w niektórych procesach uczestniczyło więcej DEGs, tabela ograniczona została do maksymalnie 20 genów o najwyższym $|\log_2FC|$ w danym procesie. Na podstawie otrzymanych danych do dalszej walidacji przy użyciu metody RT-qPCR wytypowano 5 genów – *Ces1d* ($\log_2FC = 3,17$), *Ces1f* (2,75), *Cd36* (1,31), *Nr1h3* (1,02) oraz *Cidec* (2,73). Wyniki RT-qPCR były spójne z danymi uzyskanymi dla RNA-seq i potwierdziły zwiększoną ekspresję wybranych genów w jajnikach samic LUN w porównaniu do CON (*Ces1d*: $p < 0,0001$, *Ces1f*: $p = 0,026$, *Cd36*: $p = 0,0057$, *Nr1h3*: $p = 0,0123$, *Cidec* $p = 0,0065$; Ryc. 4.16).

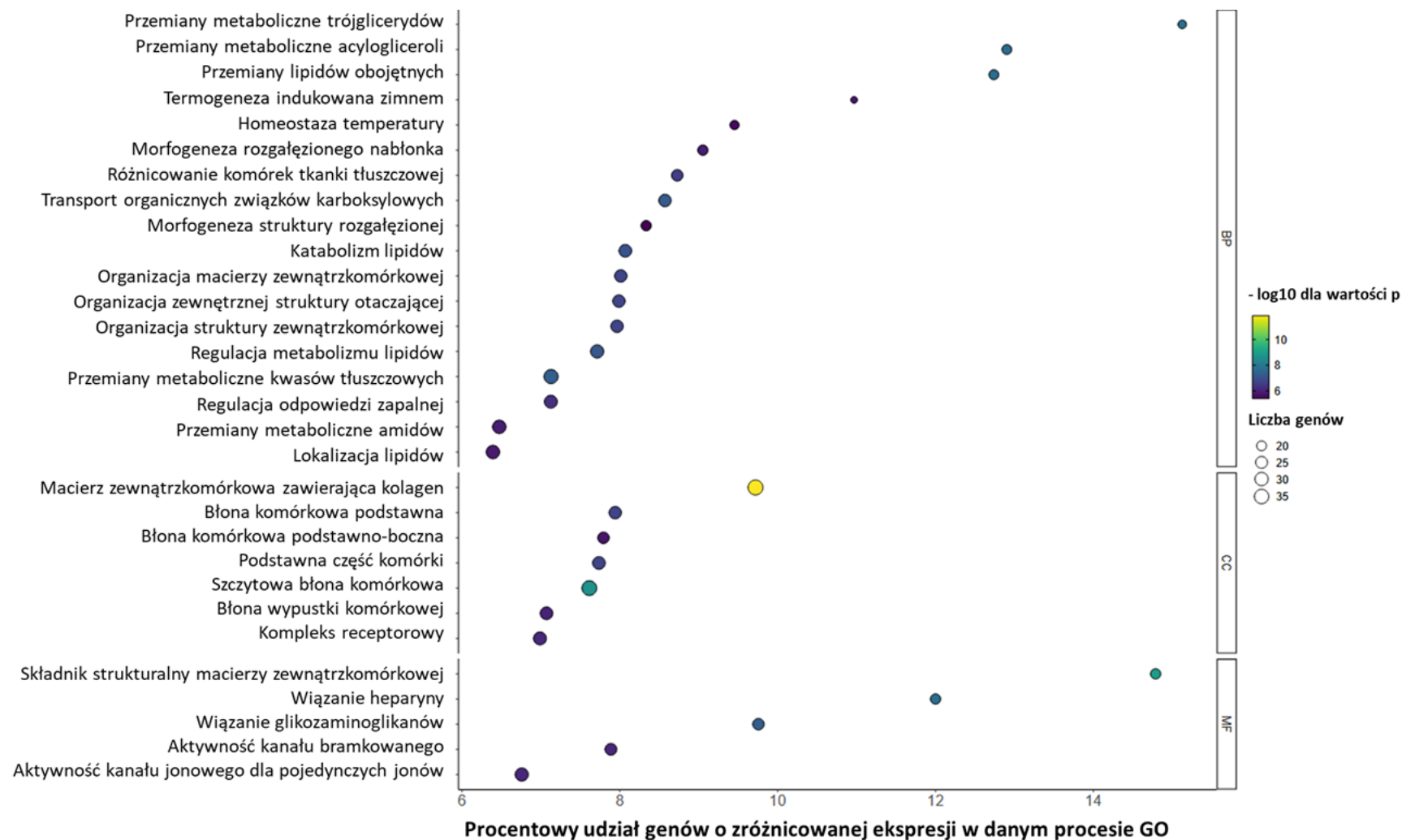
Bazując na wynikach RNA-seq i ELISA, sugerujących zahamowanie szlaków związanych z syntezą hormonów steroidowych, dodatkowo zdecydowano o walidacji wybranych genów zaangażowanych w te szlaki za pomocą RT-qPCR: *Cyp11a1* ($\log_2FC = -1,46$), *Cyp17a1* (-2,17) oraz *Hsd3b1* (-0,84). Potwierdzono wynik uzyskany dla genu *Hsd3b1* ($p < 0,001$; Ryc. 4.17-A). Dla genów *Cyp11a1* oraz *Cyp17a1* nie wykazano zmian w ekspresji za pomocą RT-qPCR (Ryc. 4.17 – A), za co odpowiedzialna mogła być większa zmienność (wariancja) wewnątrz grup CON ($0,28 \pm 0,09$ dla *Cyp11a1*) i LUN ($0,039 \pm 0,01$ dla *Cyp17a1*).

Dodatkowo, mimo że gen ten nie został wytypowany w analizie RNA-seq, zdecydowano o ocenie ekspresji genu *Star* metodą RT-qPCR. Wykazano, że w grupie LUN była ona obniżona (vs. CON; $p = 0,024$; Ryc. 4.17 – A).

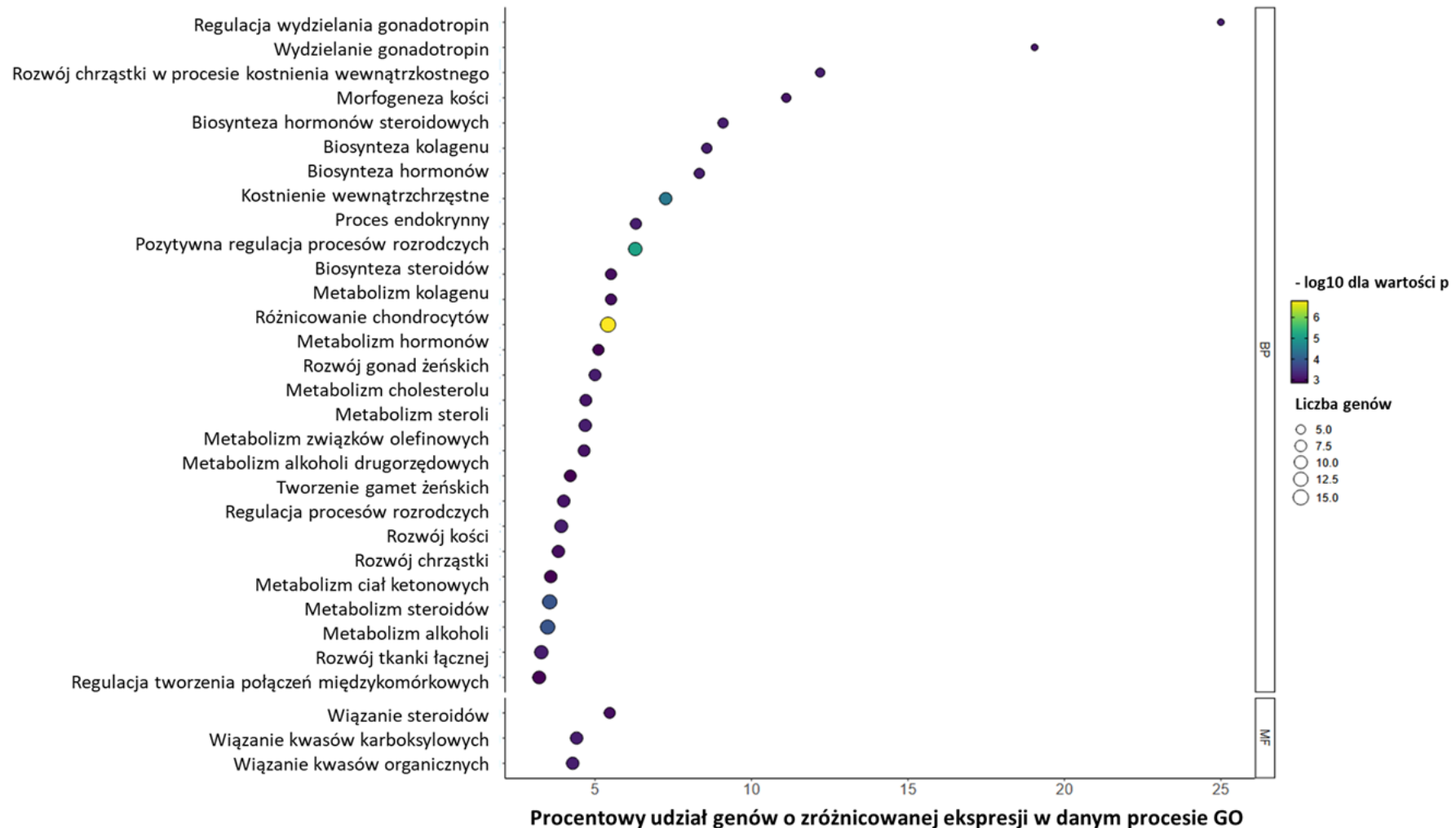
Wśród DEGs zidentyfikowano również geny kodujące receptory dla hormonów, np. E2 – *Esr1* ($\log_2FC = 0,66$), a także te kodujące podjednostki inhibin i aktywin: *Inha* (-0,72), *Inhba* (-1,97) oraz *Inhbb* (-1,37). Profil ekspresji *Esr1* był zgodny z wynikami RNA-seq (*Esr1*: $p = 0,003$, Ryc. 4.17 – B). Jego ekspresja była obniżona w grupie LUN. Natomiast spośród genów kodujących inhibiny jedynie *Inhba* wykazał różnicę w ekspresji w analizie RT-qPCR ($p < 0,0001$; Ryc. 4.17 – C).

Podobnie jak w przypadku genu *Star*, zdecydowano także ocenić ekspresję genu *Lhcgr* w jajnikach metodą RT-qPCR. W grupie LUN wykazano jej podwyższenie w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,0039$; Ryc. 4.17 – B).

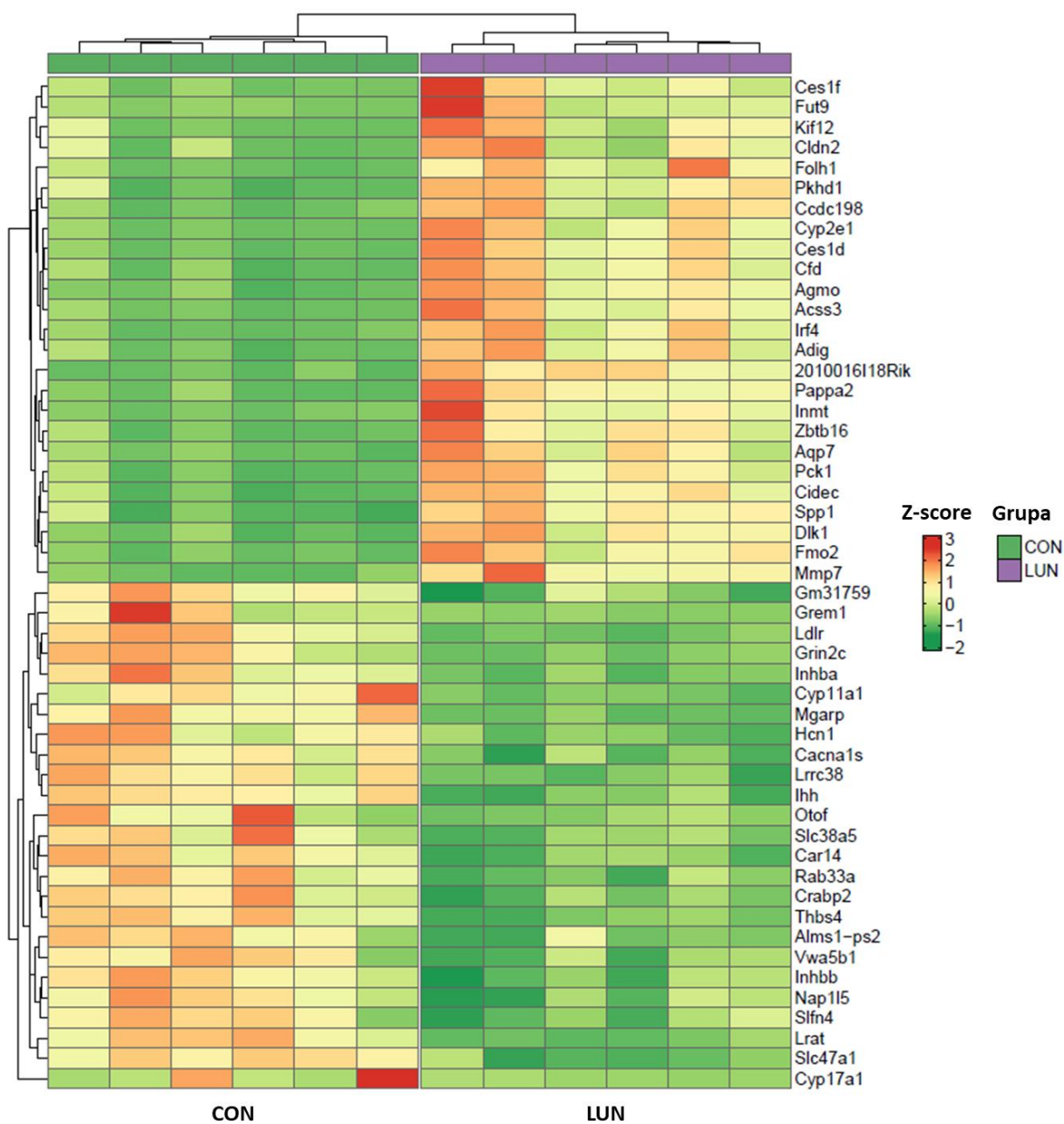
Kolejnym krokiem była ocena zmian ekspresji genów związanych ze steroidogenezą i dojrzewaniem pęcherzyków u dorosłych samic. Na rycinie 4.18 przedstawiono tylko te geny, dla których obserwowano różnice lub tendencje do różnic w ekspresji. W okresie okołopokwitaniowym profil ekspresji *Star* był podobny do tego u młodszych samic, jednak nie wykazano istotności statystycznej ($p = 0,0899$). W odróżnieniu od PND21, po osiągnięciu pełnej dojrzałości płciowej ekspresja *Hsd3b1* była wyższa u samic LUN (vs. CON; $p = 0,013$).



Ryc. 4.13 Podsumowanie wyników analizy ontologicznej (GO, ang. *Gene Ontology*) genów o podwyższonej ekspresji w jajnikach samic LUN w 21 dniu życia. Zidentyfikowano trzy główne kategorie GO: procesy biologiczne (BP), komponenty komórkowe (CC) oraz funkcje molekularne (MF). Na osi X zaznaczono procentowy udział genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs, ang. *differentially expressed genes*; $-\log_{10}$ dla wartości P-adjusted $< 0,05$ oraz $\log_2FC \geq 0,58$) przypisywanych do danego terminu GO. Kolor punktów odzwierciedla poziom istotności statycznej, z kolei ich rozmiar reprezentuje liczbę DEGs zaangażowanych w dany proces.



Ryc. 4.14 Podsumowanie wyników analizy ontologicznej (GO, ang. *Gene Ontology*) genów o obniżonej ekspresji w jajnikach samic LUN w 21 dniu życia. Zidentyfikowano dwie główne kategorie GO: procesy biologiczne (BP) oraz funkcje molekularne (MF). Na osi X zaznaczono procentowy udział genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs, ang. *differentially expressed genes*; $-\log_{10}$ dla wartości P-adjusted $< 0,05$ oraz $\log_2FC \leq -0,58$) przypisywanych do danego terminu GO. Kolor punktów odzwierciedla poziom istotności statycznej, z kolei ich rozmiar reprezentuje liczbę DEGs zaangażowanych w dany proces.



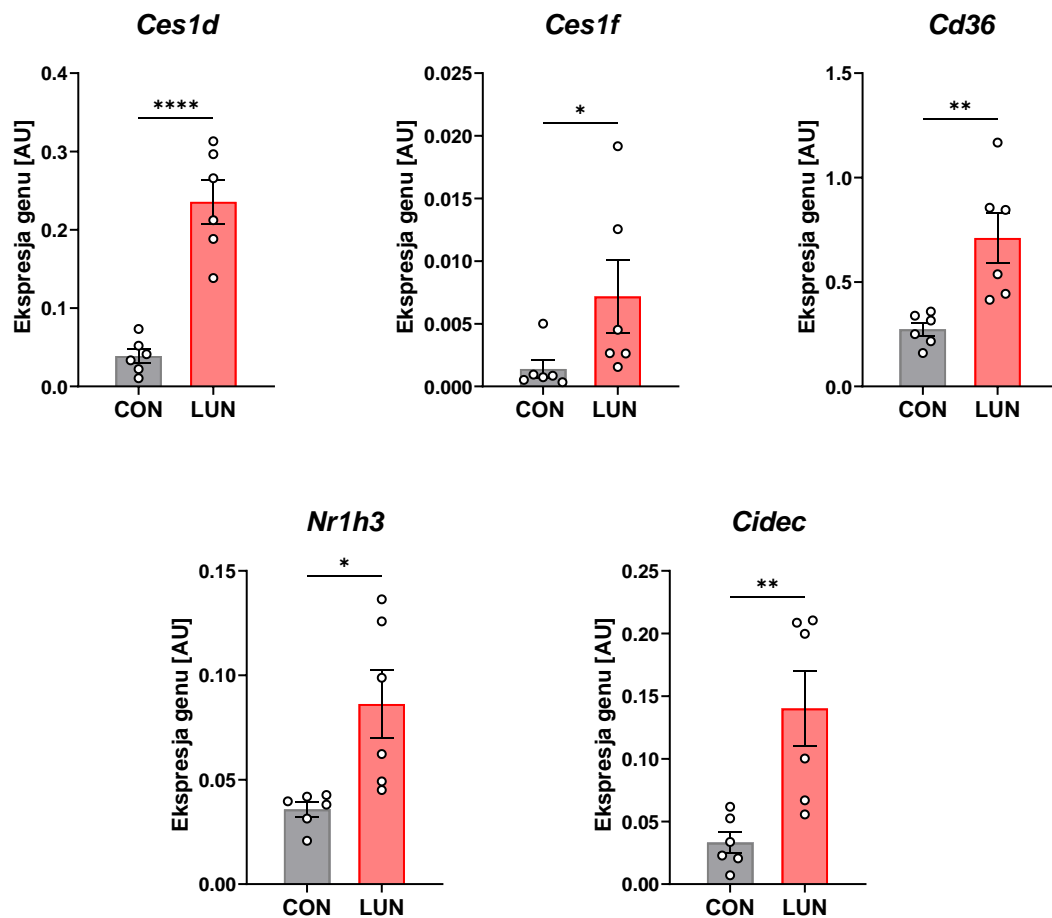
Ryc. 4.15 Mapa cieplna przedstawiająca znormalizowany profil ekspresji (Z-score) 50 genów o największych zmianach ekspresji w jajnikach samic LUN w porównaniu do CON (25 o najwyższych i 25 o najniższych wartościach \log_2FC); wiersze (geny) i kolumny (osobniki) uporządkowano metodą hierarchicznego klastrowania aglomeracyjnego z wykorzystaniem euklidesowej miary odległości i metody łączenia *complete*. Skala barw od zielonej do czerwonej oznacza odpowiednio obniżoną i podwyższoną ekspresję przedstawioną jako Z-score (wartość obliczona jako odchylenie od średniej i podzielona przez odchylenie standardowe ekspresji danego genu wśród wszystkich osobników).

Tabela 4.32 Kategorie procesów biologicznych, do których na podstawie terminów *Gene Ontology* (GO) przypisano geny o zróżnicowanej ekspresji w jajnikach samic LUN, ze szczególnym uwzględnieniem procesów związanych z metabolizmem i transportem lipidów. W każdej kategorii uwzględniono maksymalnie 20 genów o najwyższych wartościach $|\log_2FC|$. Kategorie uporządkowano według liczby przypisanych genów.

Kategoria	ID	Liczba genów	Symbole wybranych genów*
Odpowiedź na lipidy	GO:0033993	69	<i>Pck1, Ces1d, Ces1f, Spp1, Avpr1a, Slpi, Adipoq, Fmo1, Fgf10, Acp5, Pappa, Penk, Akr1c19, Ptgds, Cd36, Adh1, Sult1a1, Acsl1, Ildr1, Vdr</i>
Lokalizacja lipidów	GO:0010876	41	<i>Ces1d, Ces1f, Cidec, Spp1, Fabp4, Igfbp3, Rbp7, Pla2g4f, Adipoq, Gpihbp1, Pnpla2, Cd36, Apoc1, Acsl1, Abca8a, Nr1h3, Lpl, Agtr1a, Retn, C3</i>
Regulacja lokalizacji lipidów	GO:1905952	24	<i>Ces1d, Ces1f, Spp1, Igfbp3, Adipoq, Pnpla2, Cd36, Apoc1, Acsl1, Abca8a, Nr1h3, Lpl, Agtr1a, Retn, C3, Apoe, Ecr4, Abcb4, Pparg, Apo4</i>
Homeostaza lipidów	GO:0055088	19	<i>Ces1d, Ces1f, Fabp4, Hnf4a, Gpihbp1, Pnpla2, Negr1, Nr1h3, Lpl, Apoe, Adora1, Abcb4, Angptl4, Apo4, Rcn3, Fabp3, Gramd1b, Lipg, Ldlr</i>
Dodatnia regulacja lokalizacji lipidów	GO:1905954	19	<i>Ces1d, Ces1f, Spp1, Adipoq, Cd36, Acsl1, Abca8a, Nr1h3, Lpl, Retn, C3, Apoe, Ecr4, Abcb4, Pparg, Abca7, Fabp3, Lipg, Lrat</i>
Dodatnia regulacja transportu lipidów	GO:0032370	16	<i>Ces1d, Ces1f, Spp1, Adipoq, Acsl1, Abca8a, Nr1h3, Retn, Apoe, Ecr4, Abcb4, Pparg, Abca7, Fabp3, Lipg, Lrat</i>
Magazynowanie lipidów	GO:0019915	13	<i>Ces1d, Ces1f, Cidec, Acvr1c, Pnpla2, Negr1, Cd36, Nr1h3, Lpl, C3, Apoe, Pparg, Lrat</i>
Ujemna regulacja lokalizacji lipidów	GO:1905953	8	<i>Ces1d, Ces1f, Igfbp3, Pnpla2, Apoc1, Nr1h3, Apoe, Pparg</i>
Regulacja magazynowania lipidów	GO:0010883	8	<i>Ces1d, Ces1f, Pnpla2, Cd36, Nr1h3, Lpl, C3, Pparg</i>
Eksport lipidów z komórki	GO:0140353	6	<i>Spp1, Igfbp3, Agtr1a, Retn, Ecr4, Inhba</i>
Ujemna regulacja magazynowania lipidów	GO:0010888	5	<i>Ces1d, Ces1f, Pnpla2, Nr1h3, Pparg</i>
Regulacja rozmieszczenia lipidów w błonie	GO:0097035	5	<i>Atp10b, Kcnn4, Abcb4, Xkr4, Abca7</i>

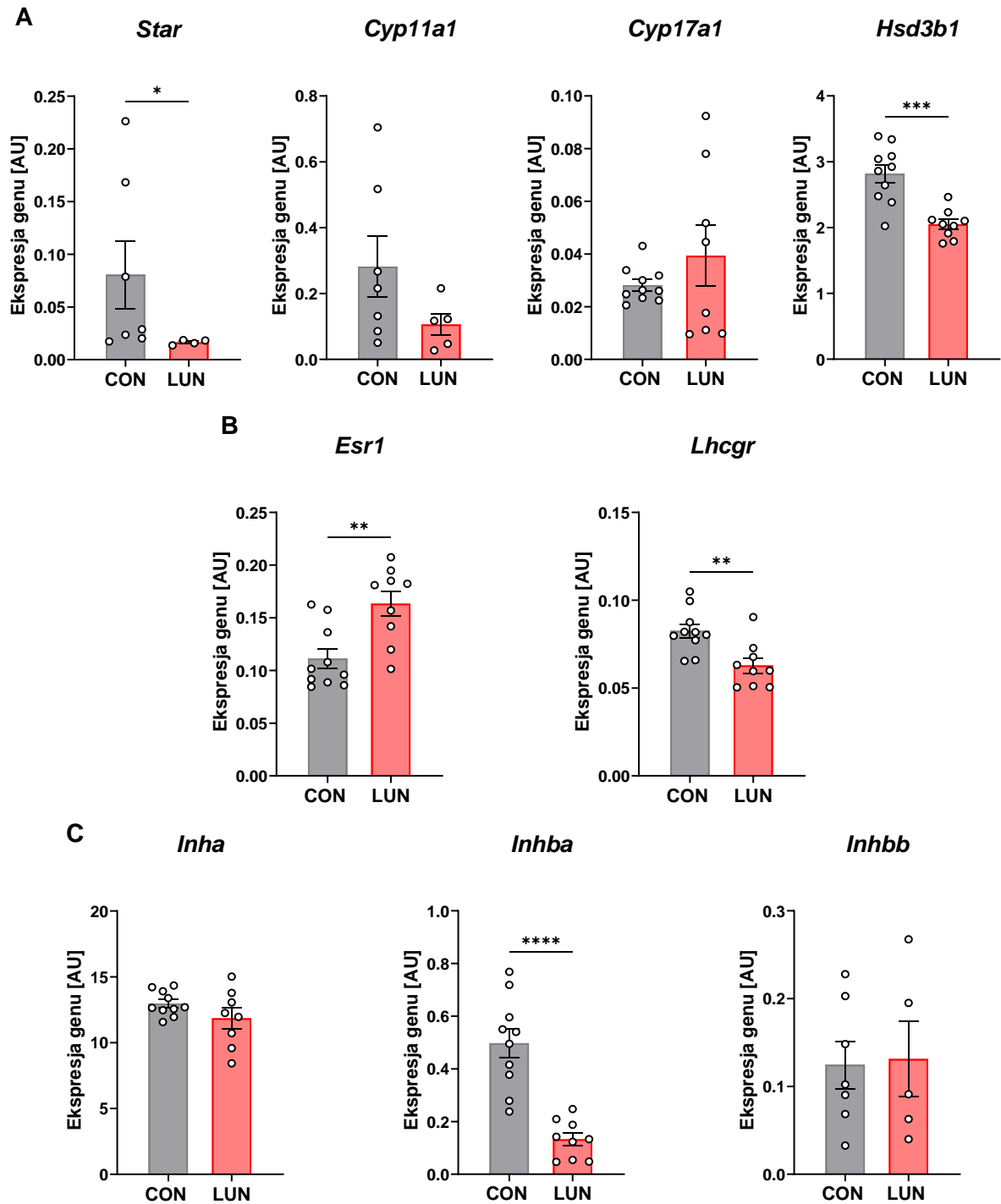
komórkowej			
Ujemna regulacja transportu lipidów	GO:0032369	4	<i>Igfbp3, Apoc1, Nr1h3, Apoe</i>
Trawienie lipidów	GO:0044241	3	<i>Cd36, Apoa4, Ldlr</i>
Dodatnia regulacja magazynowania lipidów	GO:0010884	3	<i>Cd36, Lpl, C3</i>

*maksymalnie 20 genów o najwyższym $|\log_2FC|$ w danym procesie.



Ryc. 4.16 Ekspresja wybranych genów związanych z metabolizmem lipidów w jajnikach samic pokolenia F1. Przedstawiono względną ekspresję genów *Ces1d*, *Ces1f*, *Cd36*, *Nr1h3* oraz *Cidec* w jajnikach pochodzących z 21 dnia życia (PND21). Wyniki zostały znormalizowane względem średniej geometrycznej względnej ekspresji genów referencyjnych *Hprt* oraz *Ppib* i przedstawione jako średnia \pm SEM w jednostkach umownych (AU – ang. *arbitrary units*). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test t-Studenta; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Liczebność grup (n):
CON = 6, LUN = 6

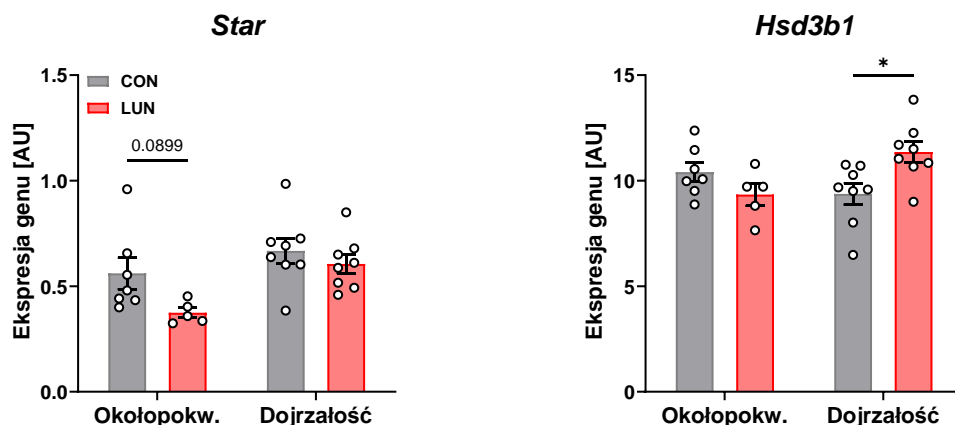


Ryc. 4.17 Ekspresja wybranych genów związanych z (A) produkcją hormonów steroidowych, (B) odpowiedzią na hormony osi HPG oraz (C) dojrzewaniem pęcherzyków jajnikowych w jajnikach samic pokolenia F1. Przedstawiono względną ekspresję genów *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*, *Esr1*, *Lhcgr*, *Inha*, *Inhba* oraz *Inhbb* w jajnikach pochodzących z 21 dnia życia. Wyniki zostały znormalizowane względem średniej geometrycznej względnej ekspresji genów referencyjnych *Hprt* oraz *Ppib* i przedstawione jako średnia \pm SEM w jednostkach umownych (AU – ang. *arbitrary units*). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test t-Studenta lub Manna-Whitneya w zależności od normalności rozkładu; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Liczebność grup (n):

Star, *Cyp11a1*, *Inhbb*: CON = 7, LUN = 5

Pozostałe geny: CON = 10, LUN = 9



Ryc. 4.18 Ekspresja wybranych genów związanych z produkcją hormonów steroidowych w jajnikach dorosłych samic pokolenia F1. Przedstawiono względną ekspresję genów *Star* oraz *Hsd3b1* w okresie okołopokwitaniowym i po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Wyniki zostały znormalizowane względem średniej geometrycznej względnej ekspresji genów referencyjnych *Hprt* oraz *Ppib* i przedstawione jako średnia \pm SEM w jednostkach umownych (AU – ang. *arbitrary units*). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Śidaka; * $p < 0,05$).

Liczebność grup (n):

Okres okołopokw.: CON = 7, LUN = 5

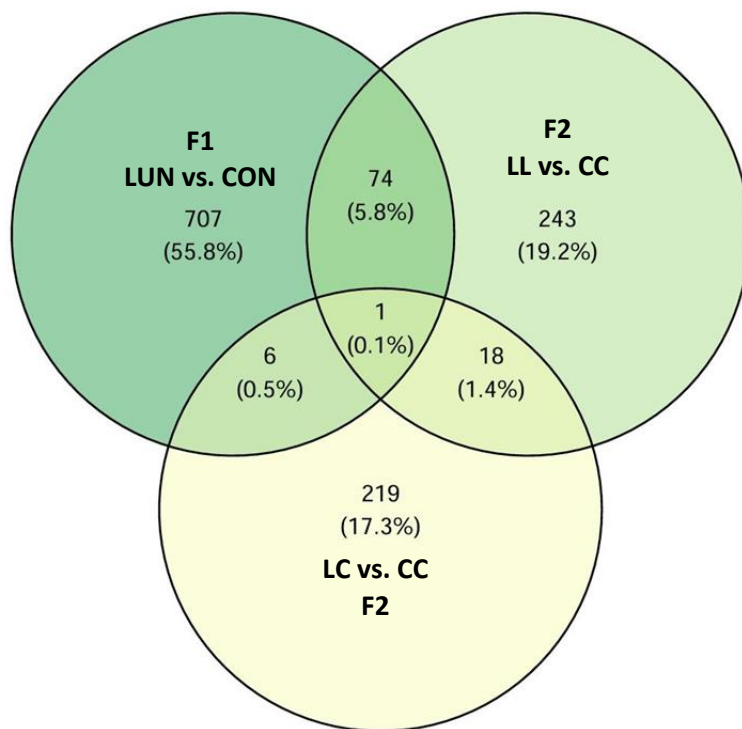
Dojrzałość: CON = 8, LUN = 8

Następnie przeprowadzono analizę porównawczą genów o zróżnicowanej ekspresji w pokoleniu F2. Liczba DEGs między grupą LL a CC wynosiła 336, natomiast między grupą LC a CC – 244. Dalsza analiza została ukierunkowana przede wszystkim na te geny, których ekspresja była istotnie zmieniona już w pokoleniu F1, tak by wyodrębniony zbiór umożliwił wskazanie genów, które mogłyby pełnić rolę molekularnych znaczników pamięci środowiskowej. W porównaniu LL vs. CC zidentyfikowano 75 DEGs wspólnych z pokoleniem F1, natomiast w porównaniu LC vs. CC było ich 7 (Ryc. 4.19).

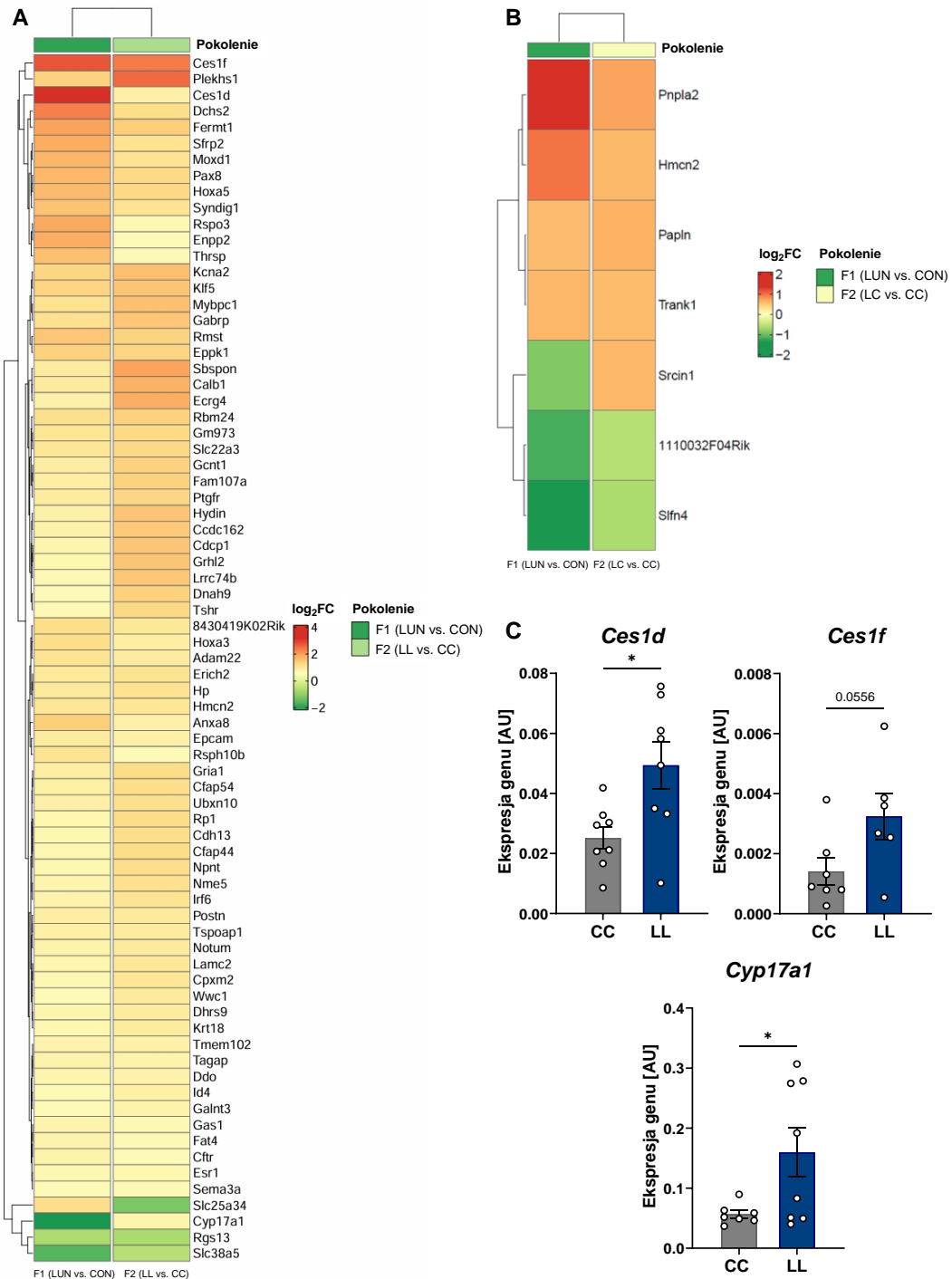
W grupie LL szczególną uwagę zwrócono na geny związane z metabolizmem lipidów: *Ces1d* ($\log_2FC = 0,81$) oraz *Ces1f* ($\log_2FC = 2,34$; Ryc. 4.20 – A). Ich ekspresję zweryfikowano za pomocą metody RT-qPCR. Wykazano podwyższoną ekspresję genu *Ces1d* w jajnikach samic LL w porównaniu do grupy CC ($p = 0,0144$; Ryc. 4.20 – C). W przypadku *Ces1f* zaobserwowano podobną tendencję, jednak różnica nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej ($p = 0,0556$; Ryc. 4.20 – C). Interesujące, że dla genu *Cyp17a1* zaobserwowano odwrotny profil ekspresji w porównaniu do wyników RNA-seq uzyskanych w pokoleniu F1 (LL vs. CC: $\log_2FC = 0,697$). Analiza RT-qPCR potwierdziła zwiększoną ekspresję tego genu w jajnikach samic LL (vs. CC; $p = 0,0373$; Ryc. 4.20 – C).

Wśród DEGs między grupą LC a grupą CC, które jednocześnie wykazywały spójność z profilem ekspresji obserwowanym w pokoleniu F1, znalazł się m.in. gen *Pnpla2*, kodujący kluczowy enzym uczestniczący w rozkładzie trójglicerydów (Ryc. 4.20 – B). Ekspresja *Pnpla2* była podwyższona zarówno u samic LUN (vs. CON, $\log_2FC = 1,38$; $p < 0,0001$), jak i samic LC (vs. CC, $\log_2FC = 0,73$; $p < 0,0001$).

Genem wspólnym dla trzech porównań okazał się *Hmcn2*, kodujący białko hemicentynę-2 odpowiedzialną za adhezję komórek (Ryc. 4.20). Ekspresja tego genu uległa zwiększeniu w grupie LUN (vs. CON, $\log_2FC = 1,00$; $p < 0,0001$), a także LC (vs. CC, $\log_2FC = 0,61$; $p = 0,000106$) i LL (vs. CC, $\log_2FC = 1,03$; $p < 0,0001$).



Ryc. 4.19 Diagram Venna ilustrujący liczbę genów o zmienionej ekspresji (DEGs, ang. *differentially expressed genes*) w jajnikach samic pokolenia F1 (porównanie LUN vs. CON) oraz F2 – w porównaniach LL vs. CC oraz LC vs. CC. Części wspólne wskazują geny, których ekspresja była zmieniona w dwóch lub trzech analizowanych grupach.



Ryc. 4.20 Profil ekspresji genów zachowany w pokoleniu F2. Mapy cieplne przedstawiają porównanie zmian ekspresji (\log_2FC) wspólnych DEGs dla: (A) F1 (LUN vs. CON) i F2 (LL vs. CC) oraz (B) F1 (LUN vs. CON) i F2 (LC vs. CC). Wiersze (geny) i kolumny (osobniki) uporządkowano metodą hierarchicznego klastrowania aglomeracyjnego z wykorzystaniem euklidesowej miary odległości i metody łączenia *complete*, a skala barw od zielonej do czerwonej oznacza odpowiednio spadek (ujemne \log_2FC) i wzrost (dodatnie \log_2FC) ekspresji. (C) Walidacja ekspresji wybranych genów (*Ces1d*, *Ces1f*, *Cyp17a1*) metodą RT-qPCR w jajnikach samic CC i LL. Wyniki zostały znormalizowane względem średniej geometrycznej względnej ekspresji genów referencyjnych *Hprt* oraz *Ppib* i przedstawione jako średnia \pm SEM w jednostkach umownych (AU – ang. *arbitrary units*). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test t-Studenta; * $p < 0,05$).

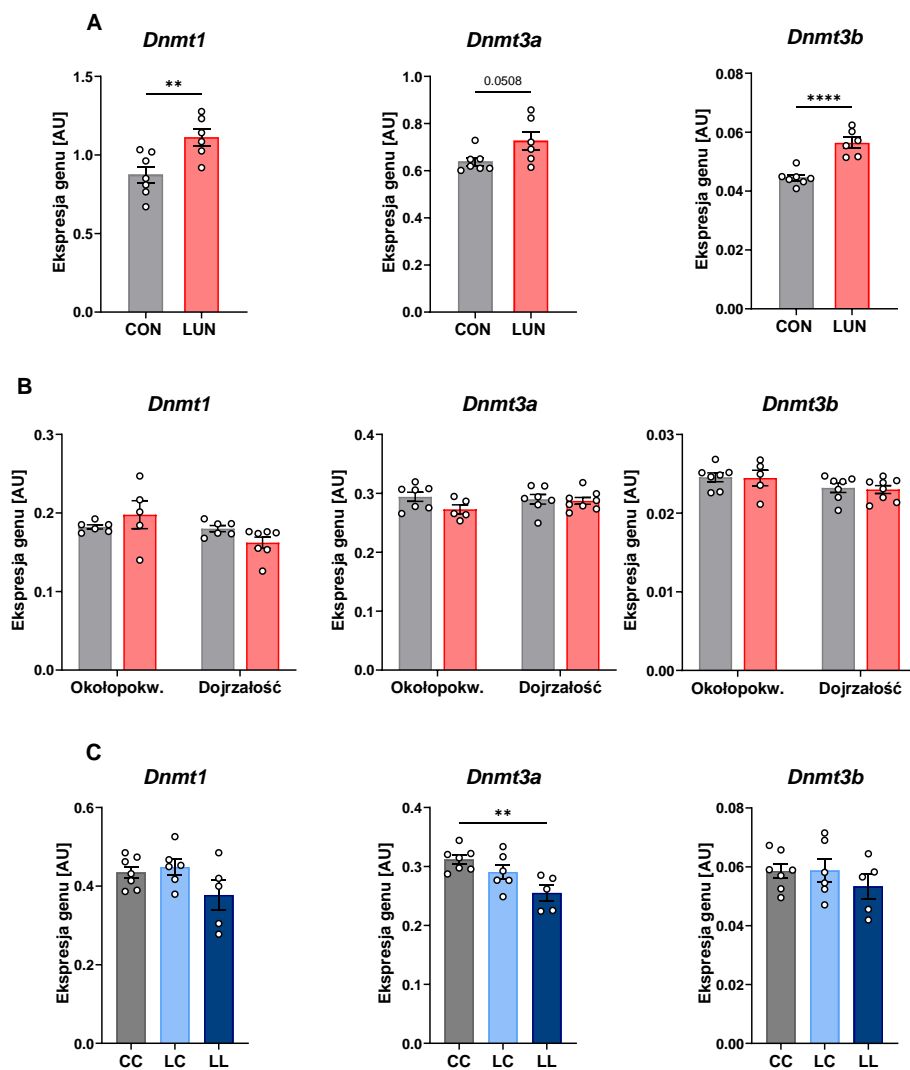
Liczebność grup (n):

Ces1d: CC = 8, LL = 8

Ces1f: CC = 7, LL = 6

Cyp17a1: CC = 7, LL = 8

W kolejnym etapie oceniono, czy stres żywieniowy we wczesnym okresie życia może modulować ekspresję genów kodujących metylotransferazy DNA (*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*) i potencjalnie wpływać na dziedziczenie epigenetyczne zmian w ekspresji genów zaangażowanych w rozwój oraz funkcjonowanie osi HPG. Wykazano, że niedożywienie matki podczas laktacji wywołuje przejściowe zwiększenie ekspresji genów kodujących analizowane metylotransferazy DNA w jajnikach samic F1 w PND21 (*Dnmt1*: $p = 0,0083$, *Dnmt3a*: $p = 0,0508$, *Dnmt3b*: $p < 0,0001$; Ryc. 4.21 – A), które nie było już zauważalne w okresie okołopokwitaniowym oraz po osiągnięciu pełnej dojrzałości płciowej (Ryc. 4.21 – B). Natomiast w pokoleniu F2 obserwowano jedynie obniżoną ekspresję *Dnmt3a* u samic LL w PND21 (vs. CC; $p = 0,0044$; Ryc. 4.21 – C).



Ryc. 4.21 Ekspresja genów kodujących metylotransferazy DNA (*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*) w jajnikach samic pokolenia F1 i F2. Ekspresja metylotransferaz DNA w jajnikach samic pokolenia: F1 w (A) PND21 oraz (B) okresie okołopokwitaniowym i dojrzałości płciowej oraz (C) F2 w PND21. Wyniki zostały znormalizowane względem średniej geometrycznej względnej ekspresji genów referencyjnych *Hprt* oraz *Ppib* i przedstawione jako średnia \pm SEM w jednostkach umownych (AU – ang. *arbitrary units*). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panel A: test t-Studenta; panel B: dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Šidaka dla porównań wielokrotnych; panel C: jednoczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Dunnetta dla porównań wielokrotnych; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Liczebność grup (n):

F1 PND21: CON = 6, LUN = 6

F1 Okres okołopokw.: CON = 7, LUN = 5

F1 Dojrzałość: CON = 7, LUN = 8

F2 PND21: CC = 7, LC = 6, LL = 5

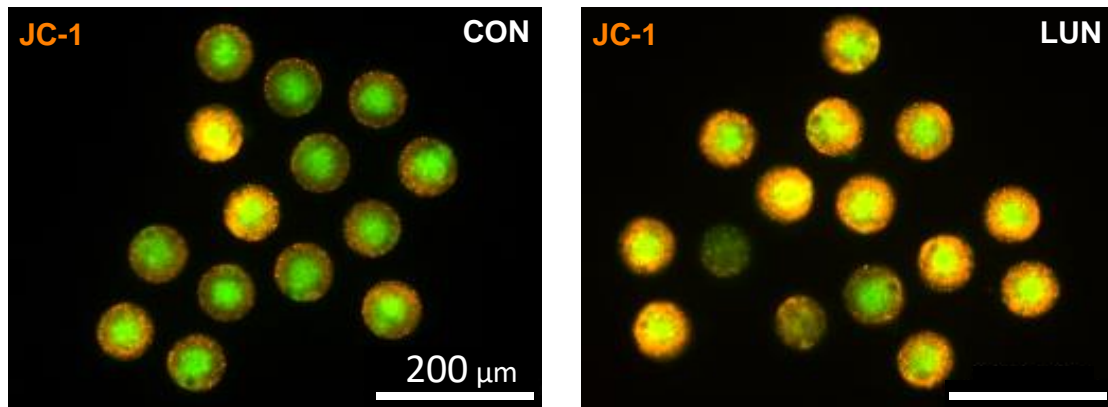
4.3 Profil metaboliczny oocytów samic pokolenia F1 i F2

Następny etap badań dotyczył wpływu stresu żywieniowego doświadczonego na wczesnym etapie życia na status metaboliczny komórek jajowych samic na przestrzeni pokoleń (F1, F2), ze szczególnym uwzględnieniem funkcji mitochondriów, stresu oksydacyjnego, równowagi redoks oraz magazynowania lipidów.

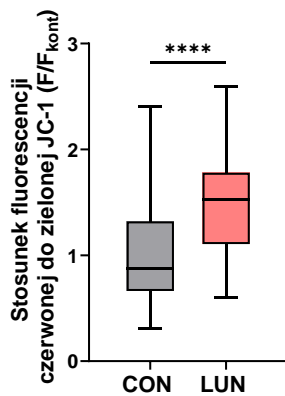
4.3.1 Potencjał błon mitochondrialnych i liczba kopii mtDNA – pokolenie F1

W pierwszym kroku oceniono, czy restrykcyjna dieta matki podczas laktacji wpływa na potencjał błon mitochondrialnych oraz liczbę mitochondriów w komórkach jajowych jej potomstwa. Wykazano, że mitochondria oocytów LUN mają zwiększony potencjał błony (vs. CON, $p < 0,0001$ Ryc. 4.22 – B). Ze względu na fakt, że barwienie barwnikiem JC-1 dostarcza ogólnej informacji na temat polaryzacji błon mitochondrialnych, postanowiono sprawdzić, czy obserwowana różnica między oocytami LUN i CON może być wynikiem zwiększonej liczby mitochondriów w komórce jajowej. W tym celu oznaczono liczbę kopii mtDNA w pojedynczym oocyte i nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami (Ryc. 4.22 – C). Zbadano także, czy zwiększony potencjał mitochondrialny przekłada się na zwiększoną produkcję ATP. Również w tym przypadku wartości nie różniły się w sposób istotny statystycznie. (Ryc. 4.22 – D).

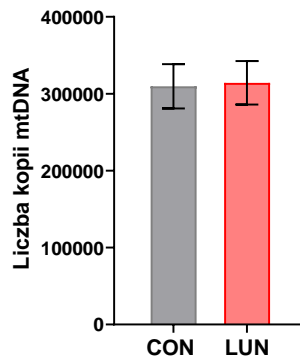
A



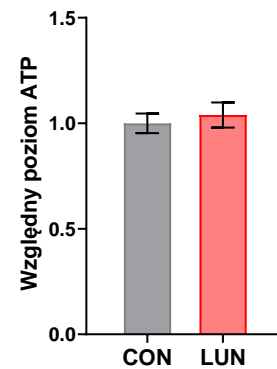
B



C



D



Ryc. 4.22 Ocena funkcji i liczby mitochondriów w oocytach samic pokolenia F1. (A) Przykładowe barwienia barwnikiem JC-1 oocytów CON i LUN; obiektyw 20x, skala 200 µm. (B) Stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej JC-1, odzwierciedlający stopień polaryzacji błony mitochondrialnej oocytów CON i LUN. (C) Liczba kopii mitochondrialnego DNA w pojedynczych oocytach CON i LUN. (D) Całkowity względny poziom ATP w oocytach CON i LUN. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl) lub średnią ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panel C: test t-Studenta; panele B i D: test Manna–Whitneya; **** $p < 0,0001$).

Liczba analizowanych oocytów w danej grupie (n):

JC-1: CON = 44; LUN = 33

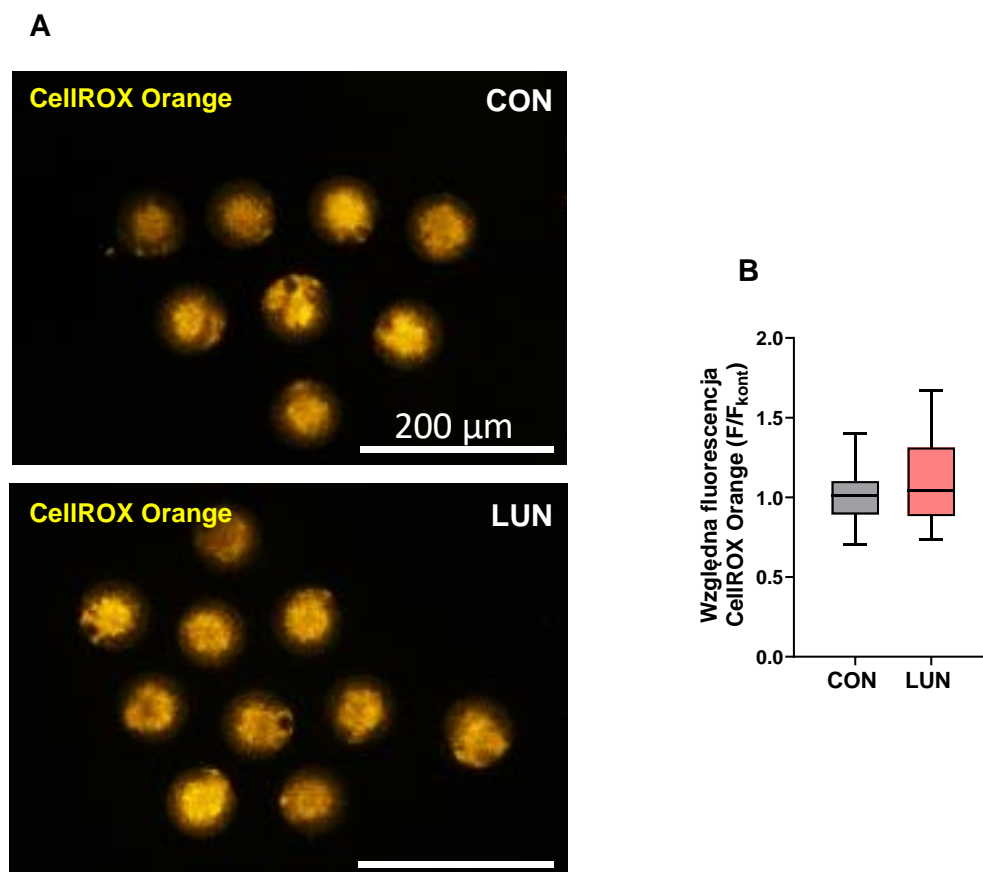
Liczebność grup (n):

mtDNA: CON = 15; LUN = 10

ATP: CON = 3; LUN = 4

4.3.2 Stres oksydacyjny – pokolenie F1

Wyniki dotyczące polaryzacji błon mitochondrialnych sugerowały, że mitochondria oocytów LUN mogą funkcjonować w stanie nadmiernej aktywności, co może prowadzić do zwiększonej produkcji ROS. Dlatego zastosowano sondę CellROX™ Orange, przeznaczoną do wykrywania stresu oksydacyjnego w żywych komórkach i wykazano, że względny poziom ROS był porównywalny w grupach LUN i CON (Ryc. 4.23).



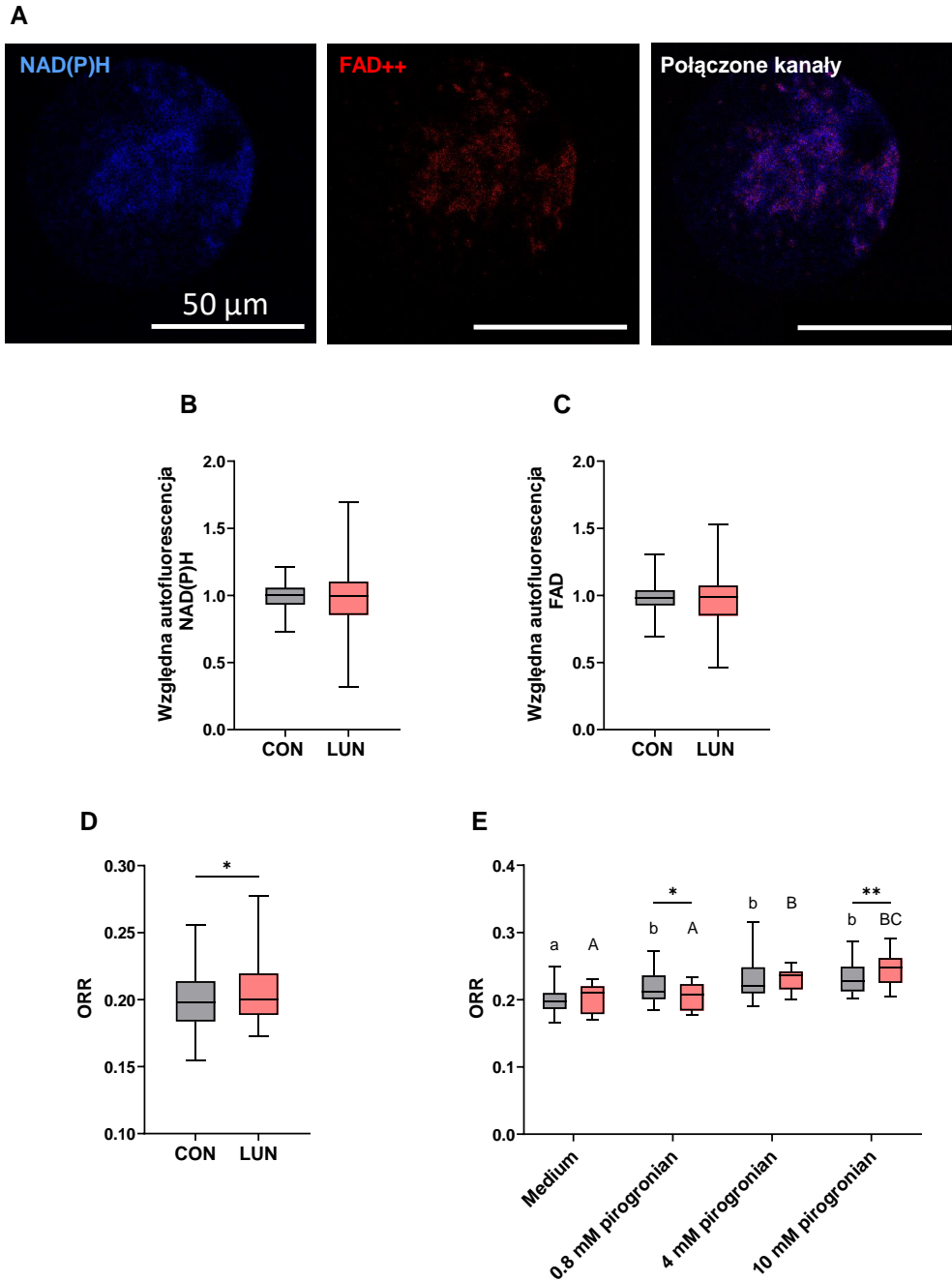
Ryc. 4.23 Poziom ROS w oocytach samic pokolenia F1. (A) Przykładowe barwienia oocytów CON i LUN sondą CellROX Orange; obiektyw 20x, skala 200 μm . (B) Poziom ROS w komórkach jajowych CON i LUN. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl). Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (test Manna–Whitneya).

Liczba analizowanych oocytów w danej grupie (n):
CON = 44; LUN = 45

4.3.3 Równowaga redox – pokolenie F1

Z uwagi na wcześniejsze obserwacje sugerujące zwiększony potencjał błony mitochondrialnej w oocytach LUN, postanowiono ocenić aktywność metaboliczną oocytów badając status redoks komórek jajowych na podstawie autofluorescencji NAD(P)H i FAD (Ryc. 4.24). Zarówno NAD(P)H, jak i FAD wytwarzane są w cyklu Krebsa, a następnie utleniane w szlaku mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej, dostarczając elektrony do łańcucha transportu elektronów. Choć poziomy autofluorescencji NAD(P)H (Ryc. 4.24 – B) oraz FAD (Ryc. 4.24 – C) w oocytach LUN nie różniły się istotnie od wartości w grupie CON, to optyczny wskaźnik redoks (ORR) był już wyraźnie wyższy w grupie LUN ($p = 0,0152$; Ryc. 4.24 – D).

Pirogronian jest kluczowym metabolitem dostarczającym oocytom głównie przez komórki otaczające i stanowi podstawowe źródło acetylokoenzymu A w cyklu Krebsa. Dlatego w kolejnym kroku oceniono zdolności oocytów do wykorzystania pirogronianu stosując analizę zmian wskaźnika ORR w odpowiedzi na różne stężenia tego substratu energetycznego. Oocyty CON zareagowały stopniowym zwiększeniem ORR wraz ze wzrostem stężenia pirogronianu (vs. medium bez dodatku; 0,8 mM $p = 0,007$, 4 mM i 10 mM $p < 0,0001$). W oocytach LUN nie zaobserwowano wzrostu ORR przy najniższym stężeniu (0,8 mM), w przeciwieństwie do wyższych stężeń (vs. medium bez dodatków: 4 mM i 10 mM $p < 0,0001$). Dla najniższego stężenia pirogronianu wartość ORR pozostawała niższa w grupie LUN niż w grupie CON ($p = 0,0328$; Ryc. 4.24 – E). Natomiast przy najwyższym stężeniu pirogronianu (10 mM) wartości ORR w grupie LUN przewyższały te obserwowane w grupie kontrolnej ($p = 0,0088$; Ryc. 4.24 – E).



Ryc. 4.24 Autofluorescencja NAD(P)H i FAD oraz wskaźnik potencjału redox w oocytach samic pokolenia F1. (A) Reprezentatywne obrazy autofluorescencji NADPH oraz FAD w oocytach CON i LUN; obiektyw 40x, skala 50 μm . (B-C) Średnia intensywność autofluorescencji NADPH i FAD oocytów CON i LUN. (D) Wskaźnik redox (ORR, ang. *optical redox ratio*), obliczony na podstawie autofluorescencji NADPH i FAD w oocytach CON i LUN. (E) Wpływ różnych stężeń pirogromianu na wartość ORR w oocytach CON i LUN. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panele B-D: test Manna–Whitneya; panel E: dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Śidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Panel E: identyczne litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic między dawkami pirogromianu w obrębie danej grupy (CON, LUN), natomiast różne litery wskazują na istotne różnice statystyczne ($p < 0,01$).

Liczba analizowanych oocytów w danej grupie (n):

NAD(P)H; FAD; ORR: CON = 154; LUN = 128

Medium: CON = 31; LUN = 32

0,8 mM: CON = 33; LUN = 27

4 mM: CON = 43; LUN = 27

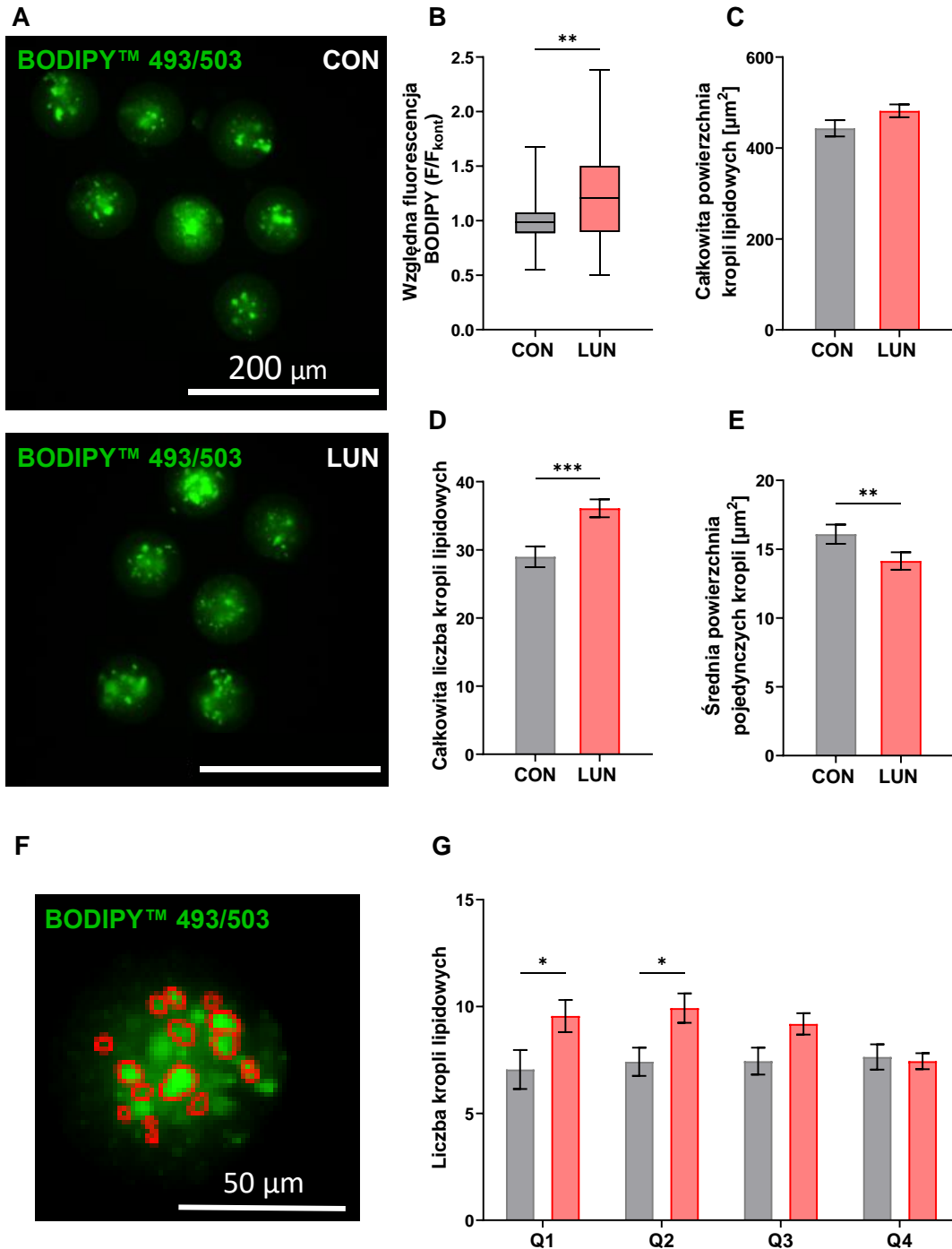
10 mM: CON = 37; LUN = 33

4.3.4 Krople lipidowe – pokolenie F1

Wyniki analizy RNA-seq, wskazujące na zwiększoną ekspresję genów związanych z metabolizmem lipidów w połączeniu z wcześniejszymi obserwacjami sugerującymi zmiany w metabolizmie oocytów, sugerowały konieczność przeprowadzenia oceny liczby oraz morfologii kropli lipidowych w komórkach jajowych. W tym celu zastosowano barwnik BODIPY™ 493/503, który wiąże się z lipidami obojętnymi i umożliwia wizualizację kropli lipidowych (Ryc. 4.25).

W pierwszym kroku oceniono całkowitą fluorescencję barwnika BODIPY™ 493/503 w komórkach jajowych. Stwierdzono, że była ona wyższa w oocytach LUN (vs. CON, $p = 0,0072$; Ryc. 4.25 – B), co wskazuje na zwiększoną zawartość lipidów obojętnych. Następnie przeprowadzono szczegółową analizę morfologii pojedynczych kropli lipidowych. Pomimo braku różnic w łącznej powierzchni zajętej przez krople lipidowe (Ryc. 4.25 – C), zaobserwowano większą całkowitą liczbę kropli lipidowych w oocytach LUN ($p = 0,0003$; Ryc. 4.25 – D), przy jednoczesnym zmniejszeniu średniej powierzchni pojedynczych kropli w porównaniu do grupy CON ($p = 0,004$; Ryc. 4.25 – E).

W następnym kroku dokonano klasyfikacji kropli do czterech kategorii. Na podstawie rozkładu zmiennej X w grupie CON wyznaczono wartości kwartyłowe (Q), a następnie rozmiary kropli przyporządkowano do czterech przedziałów ($Q1$ – $Q4$). Zastosowanie tego podziału ujawniło, że w oocytach LUN częściej występowały drobne krople lipidowe (vs CON; $Q1$: $p = 0,0304$, $Q2$: $p = 0,0295$; Ryc. 4.25 – G).



Ryc. 4.25 Krople lipidowe w oocytach samic pokolenia F1. (A) Przykładowe zdjęcia oocytów CON i LUN wybarwionych BODIPY 493/503; obiektyw 20x, skala 200 μm lub 50 μm . (B) Względna intensywność fluorescencji BODIPY 493/503 w oocytach CON i LUN. (F) Przykładowy obraz analizy powierzchni kropli lipidowych w pojedynczym oocycie (CON lub LUN). Wyniki analizy ilościowej: (C) całkowita powierzchnia kropli lipidowych, (D) całkowita liczba kropli lipidowych, (E) średnia powierzchnia pojedynczych kropli, (G) liczba kropli lipidowych o różnych rozmiarach w oocytach CON i LUN. Rozmiary kropli podzielono na kwartyle (Q1-Q4) zgodnie z rozkładem zmiennej X w grupie CON. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl) lub średnią \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panel C: test t-Studenta, panele B, D, E: test Manna–Whitneya, panel G: dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Šidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Liczba analizowanych oocytów w danej grupie (n):

Fluorescencja BODIPY: CON = 47; LUN = 54

Pozostałe analizy: CON = 36; LUN = 54

4.3.5 Potencjał błon mitochondrialnych i liczba kopii mtDNA – pokolenie F2

Analizy przeprowadzone na oocytach pokolenia F2 wykazały, że jedynie komórki jajowe potomstwa, którego oboje rodziców doświadczyło niedożywienia we wczesnym okresie życia (grupa LL), charakteryzowały się zwiększoną aktywnością błony mitochondrialnej ($p = 0,0131$; Ryc. 4.26 – B). Co istotne, podobnie jak w przypadku samic z pokolenia F1, efekt ten nie był skorelowany ze zmianą liczby kopii mtDNA, ani względnym poziomem ATP (Ryc. 4.26 – C i D).

4.3.6 Stres oksydacyjny – pokolenie F2

Pomimo, że w pokoleniu F1 nie wykazano różnic między oocytami LUN i CON, w pokoleniu F2 poziom ROS w oocytach pochodzących od samic LL był obniżony (vs. CC, $p = 0,0002$; Ryc. 4.27 – B).

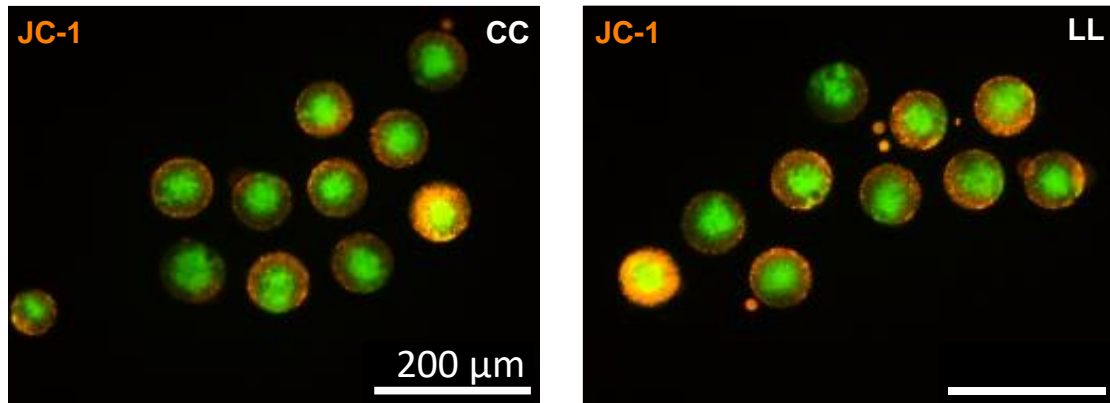
4.3.7 Równowaga redox – pokolenie F2

W celu dalszego zbadania statusu redoks w oocytach pokolenia F2 przeprowadzono pomiar autofluorescencji NAD(P)H oraz FAD. Poziomy obu nukleotydów były obniżone (vs. CC, $p < 0,0001$; Ryc. 4.28 – A i B), a ORR podwyższony w oocytach samic LL (vs. CC, $p = 0,0491$; Ryc. 4.28 – C). Natomiast w obecności pirogronianu – oocyty LL wykazywały tylko niewielki wzrost ORR przy stężeniu 4 mM (vs. medium bez dodatków, $p = 0,03$; Ryc. 4.28 – D). ORR w tej grupie nie różnił się też znacząco od grupy CC dla żadnej z zastosowanych dawek pirogronianu. Dla porównania, w oocytach LC obserwowano podwyższony ORR dla dawek 4 i 10 mM (vs. medium bez dodatków, $p = 0,005$ i $p < 0,0001$, odpowiednio), a przy dawce 4 mM ORR był podwyższony w porównaniu do oocytów z grupy CC ($p = 0,02$).

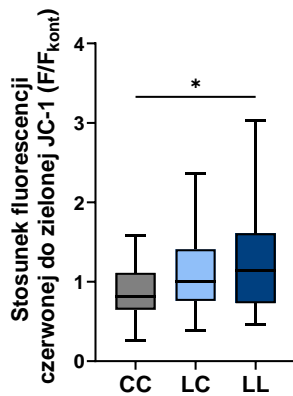
4.3.8 Krople lipidowe – pokolenie F2

Podobnie jak u samic LUN z pokolenia F1, również w pokoleniu F2 stwierdzono zwiększoną zawartość lipidów obojętnych w oocytach samic LC oraz LL w porównaniu do grupy CC ($p < 0,0001$; Ryc. 4.29 – B). Choć całkowita średnia powierzchnia i liczba kropli lipidowych utrzymywała się na wyższym poziomie w oocytach samic LL, nie osiągnięto poziomu istotności statystycznej ($p = 0,0771$ i $0,0881$ kolejno; Ryc. 4.29 – C i D). Nie wykryto też różnic w średniej wielkości kropli lipidowych pomiędzy grupami (Ryc. 4.29 – E). Natomiast analiza rozkładu wielkości kropli ujawniła, że oocyty samic LL zawierały zwiększony odsetek drobnych kropli lipidowych w porównaniu do grupy CC (Q2: $p = 0,0404$; Ryc. 4.29 – F).

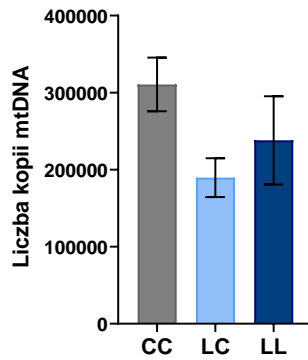
A



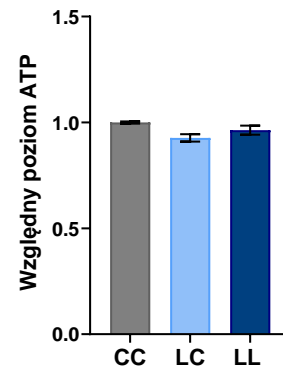
B



C



D



Ryc. 4.26 Ocena funkcji i liczby mitochondriów w oocytach samic pokolenia F2. (A) Przykładowe barwienia barwnikiem JC-1 oocytów CC i LL; obiektyw 20x, skala 200 µm. (B) Stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej JC-1, odzwierciedlający stopień polaryzacji błony mitochondrialnej oocytów CC, LC i LL. (C) Liczba kopii mitochondrialnego DNA w pojedynczych oocytach CC, LC i LL. (D) Całkowity względny poziom ATP w oocytach CC, LC i LL. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl) lub średnią ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunna; * $p < 0,05$).

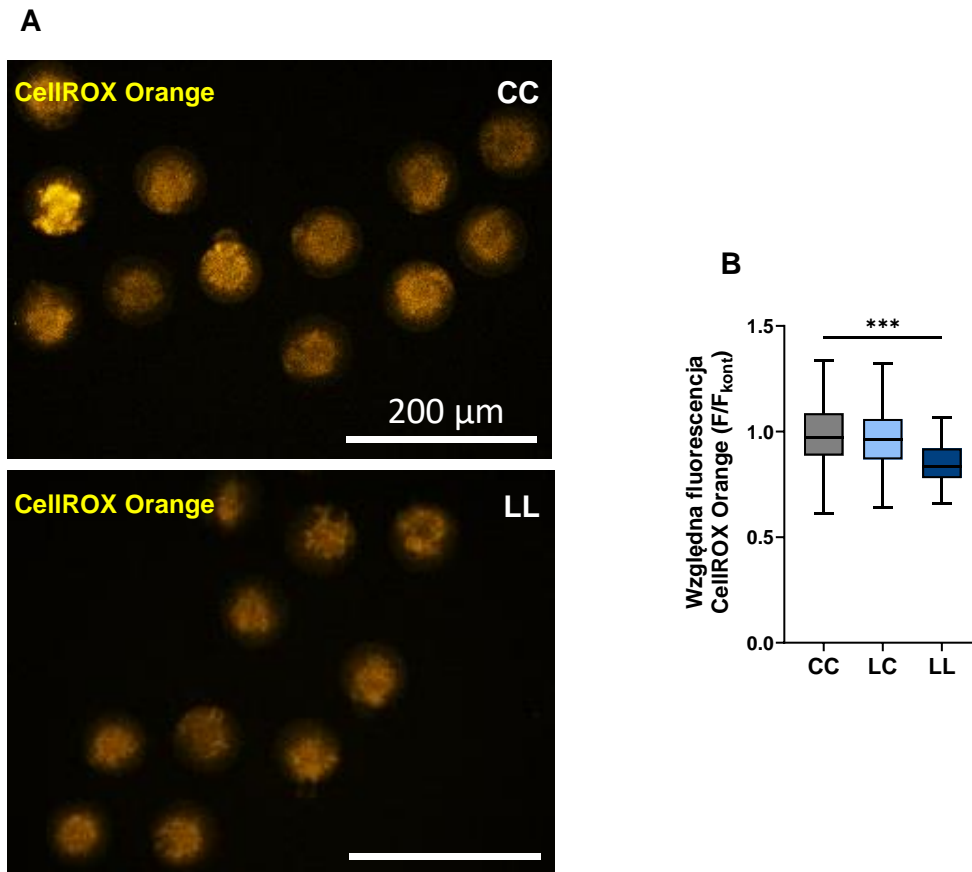
Liczba analizowanych oocytów w danej grupie (n):

JC-1: CC = 51; LC = 35; LL = 35

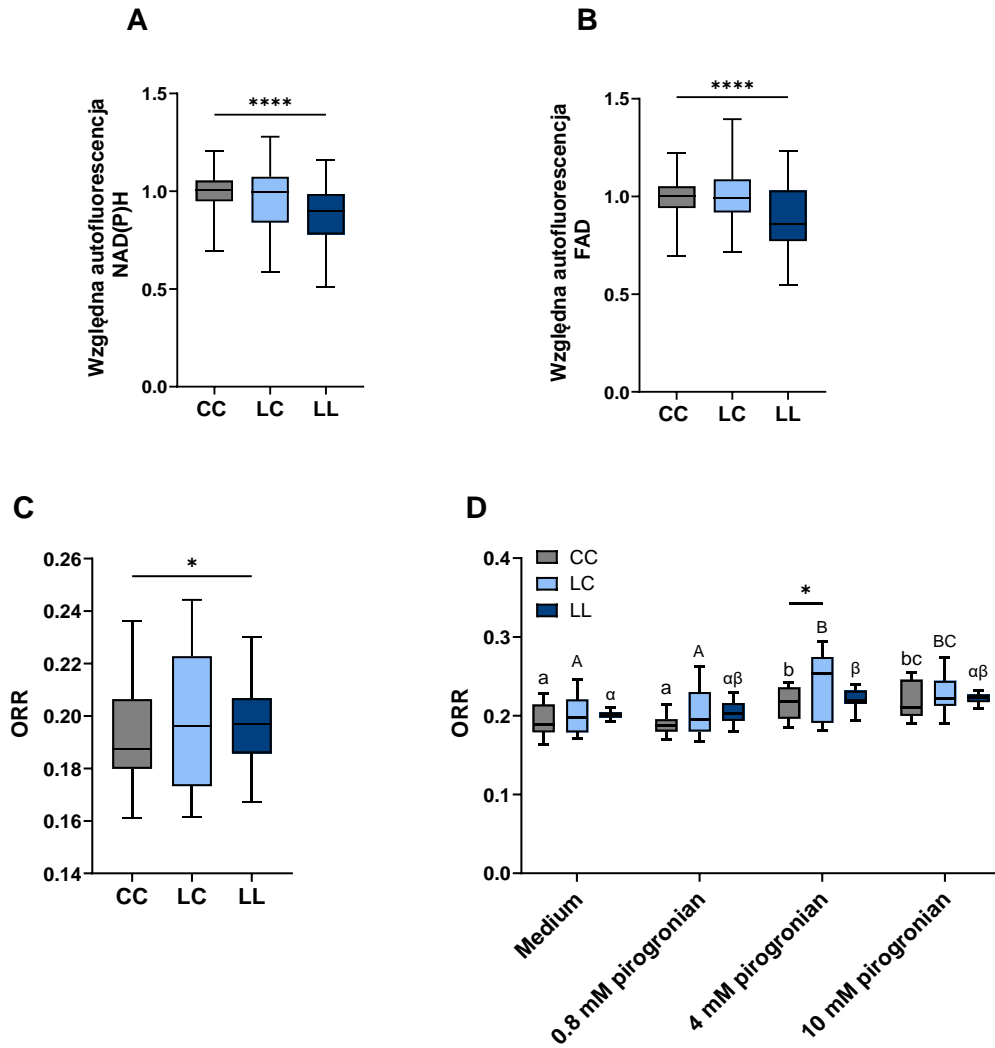
Liczebność grup (n):

mtDNA: CC = 4; LC = 3; LL = 4

ATP: CC = 5; LC = 2; LL = 4



Ryc. 4.27 Poziom ROS w oocytach samic pokolenia F₂; obiektyw 20x, skala 200 μ m. (A) Przykładowe barwienia oocytów CC, LC oraz LL sondą CellROX Orange. (B) Poziom ROS w komórkach jajowych CC, LC oraz LL. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test Kruskala–Wallisa z testem *post hoc* Dunna; *** $p < 0,001$). Liczba analizowanych oocytów w danej grupie (n): CC = 35; LC = 34; LL = 30



Ryc. 4.28 Autofluorescencja NAD(P)H i FAD oraz wskaźnik potencjału redox w oocytach samic pokolenia F2. (A-B) Średnia intensywność autofluorescencji NADPH i FAD oocytów CC, LC i LL. (C) Wskaźnik redox (ORR, ang. *optical redox ratio*), obliczony na podstawie autofluorescencji NAD(P)H i FAD w oocytach CC, LC i LL. (D) Wpływ różnych stężeń pirogionianu na wartość ORR w oocytach CC, LC i LL. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panele A-C: test Manna–Whitneya; panel E: dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Šidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Panel E: identyczne litery oznaczają brak istotnych statystycznie różnic między dawkami pirogionianu w obrębie danej grupy (CC, LC, LL), natomiast różne litery wskazują na istotne różnice statystyczne ($p < 0,05$).

Liczba analizowanych oocytów w danej grupie (n):

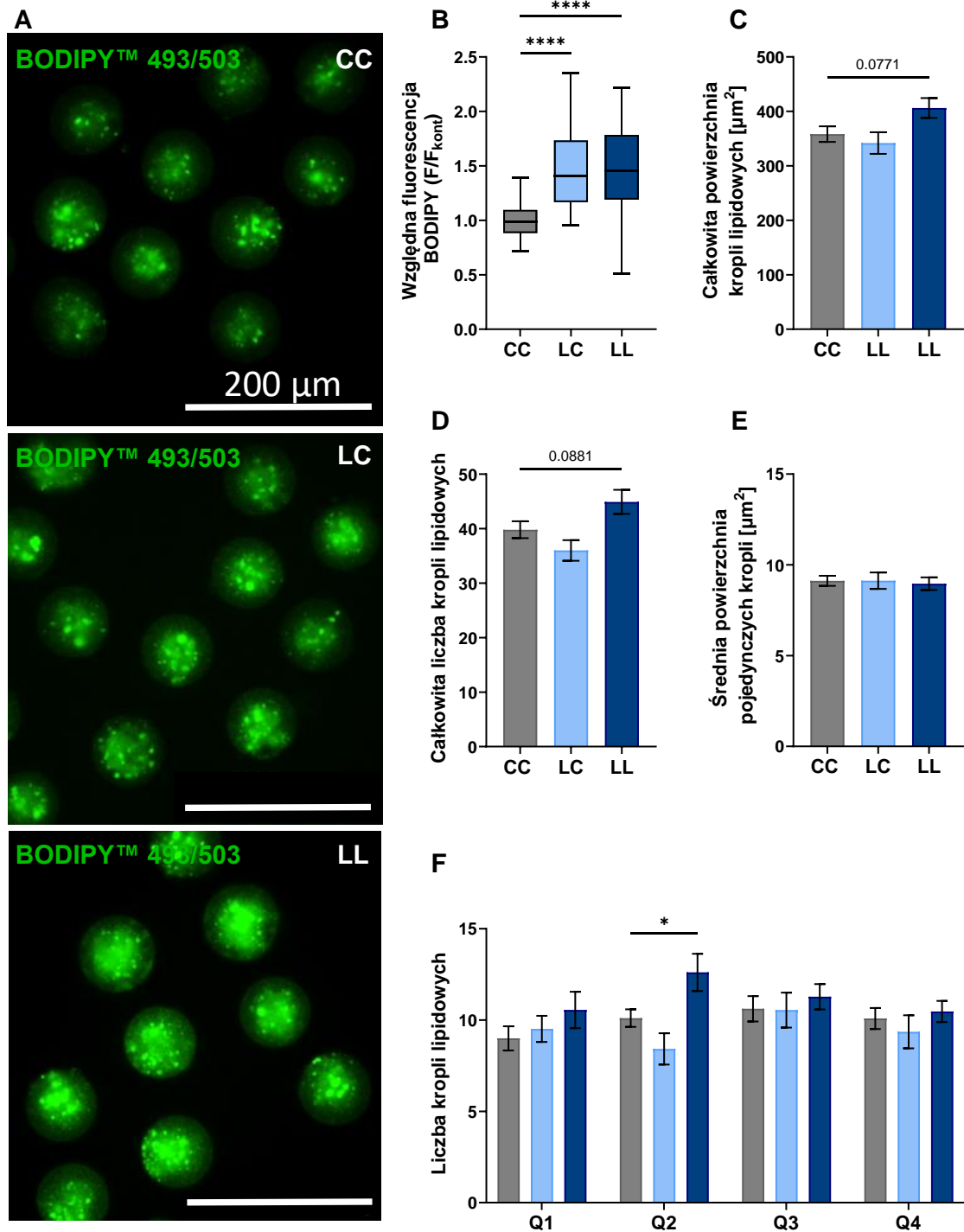
NAD(P)H; FAD++; ORR: CC = 83; LC = 65; LL = 69

Medium: CC = 23; LC = 18; LL = 13

0,8 mM: CC = 22; LC = 18; LL = 19

4 mM: CC = 17; LC = 9; LL = 20

10 mM: CC = 15; LC = 19; LL = 10



Ryc. 4.29 Krople lipidowe w oocytach samic pokolenia F2. (A) Przykładowe zdjęcia oocytów CC, LC oraz LL wybarwionych BODIPY 493/503; obiektyw 20x, skala 200 μm. (B) Względna intensywność fluorescencji BODIPY 493/503 w oocytach CC, LC i LL. (C-E) Wyniki analizy ilościowej: (C) całkowita powierzchnia kropli lipidowych, (D) całkowita liczba kropli lipidowych, (E) średnia powierzchnia pojedynczych kropli, (G) liczba kropli lipidowych o różnych rozmiarach w oocytach CC, LC i LL. Rozmiary kropli podzielono na kwartyle (Q1-Q4) zgodnie z rozkładem zmiennej X w grupie CC. Dane przedstawiono jako medianę (IQR: 25.–75. percentyl) lub średnią ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panele B-E: jednoczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Dunnetta; panel F: dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Śidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

Liczebność grup (n):

CC = 48; LC = 32; LL = 40

4.4 Skutki niedożywienia matki w czasie laktacji – zmiany na poziomie podwzgórza

Z uwagi na obserwowane w badanym modelu niedożywienia opóźnienie dojrzewania płciowego u samic, dalsza część pracy koncentruje się na analizie zmian na poziomie podwzgórza, stanowiąc kontynuację pracy Kaczmarek i in. (2016).

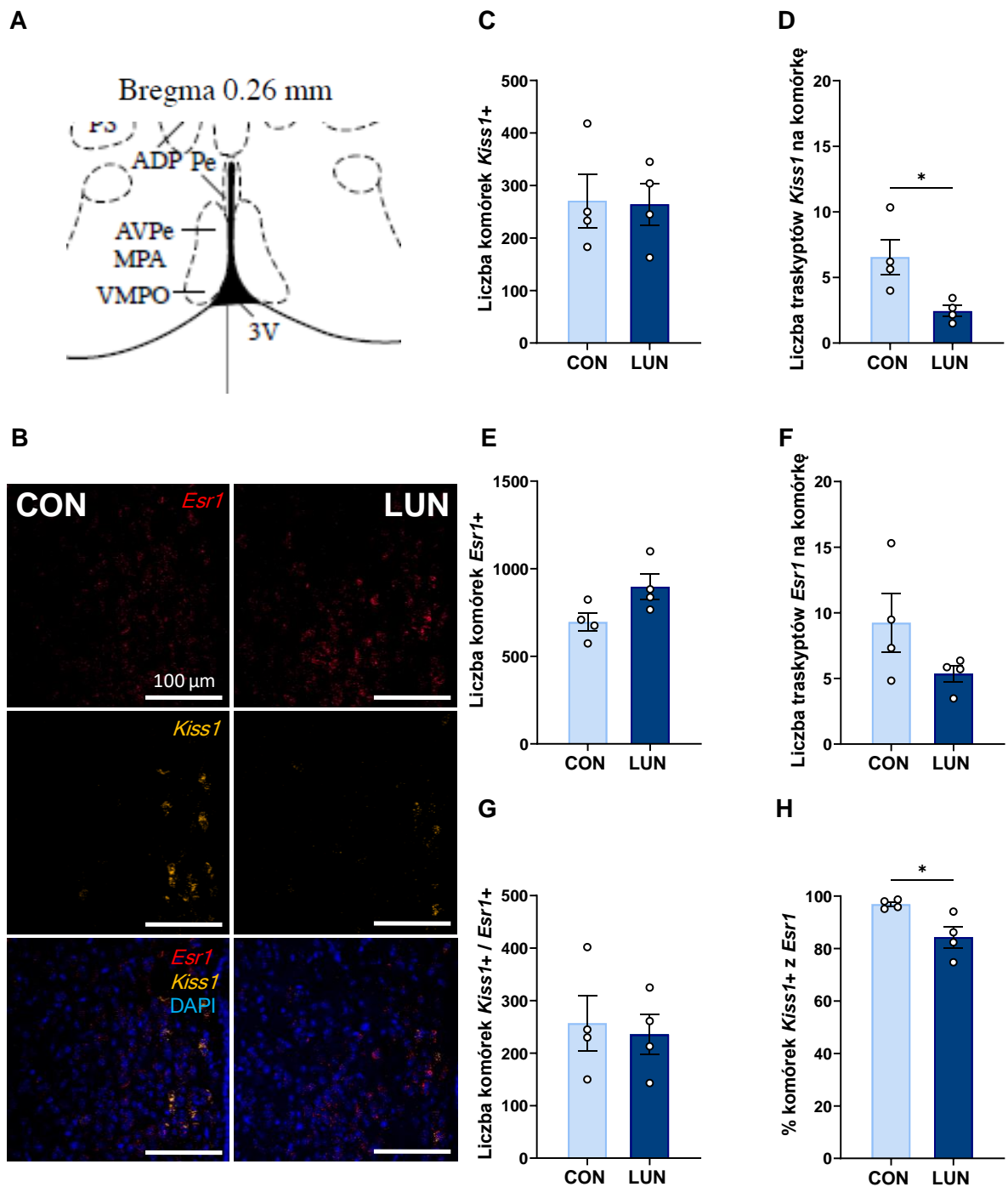
4.4.1 Przestrzenny wzór ekspresji genów w podwzgórzu – hybrydyzacja *in situ*

W pierwszym etapie oceniono przestrzenną lokalizację transkryptów *Kiss1* oraz *Esr1* w AVPV/PeN (bregma ~ +0,26 mm do -0,22 mm) oraz ARC (~ -1,46 mm do -2,46 mm) w 21 dniu życia za pomocą hybrydyzacji *in situ*.

Nie stwierdzono różnic w liczbie komórek *Kiss1+* i *Esr1+* w obrębie AVPV/PeN i ARC pomiędzy grupami (Ryc. 4.30 – C, E; Ryc. 4.31 – C, E). Wykazano natomiast, że o ile w ARC liczba transkryptów *Kiss1* przypadająca na jedną komórkę *Kiss+* utrzymywała się na podobnym poziomie u samic CON i LUN (Ryc. 4.31 – D), to w obrębie AVPV/PeN była obniżona u samic LUN (vs. CON; $p = 0,0268$; Ryc. 4.30 – D). Liczba transkryptów *Esr1* przypadająca na jedną komórkę *Esr1+* w obu badanych obszarach podwzgórza nie zmieniła się (Ryc. 4.30 – F; Ryc. 4.31 – F).

W analizie współekspresji *Kiss1* oraz *Esr1* w AVPV/PeN wykazano obniżony odsetek komórek *Kiss1+* wykazujących ekspresję *Esr1* ($p = 0,0286$; Ryc. 4.30 – H), podczas gdy w ARC nie odnotowano różnic (Ryc. 4.31 – H).

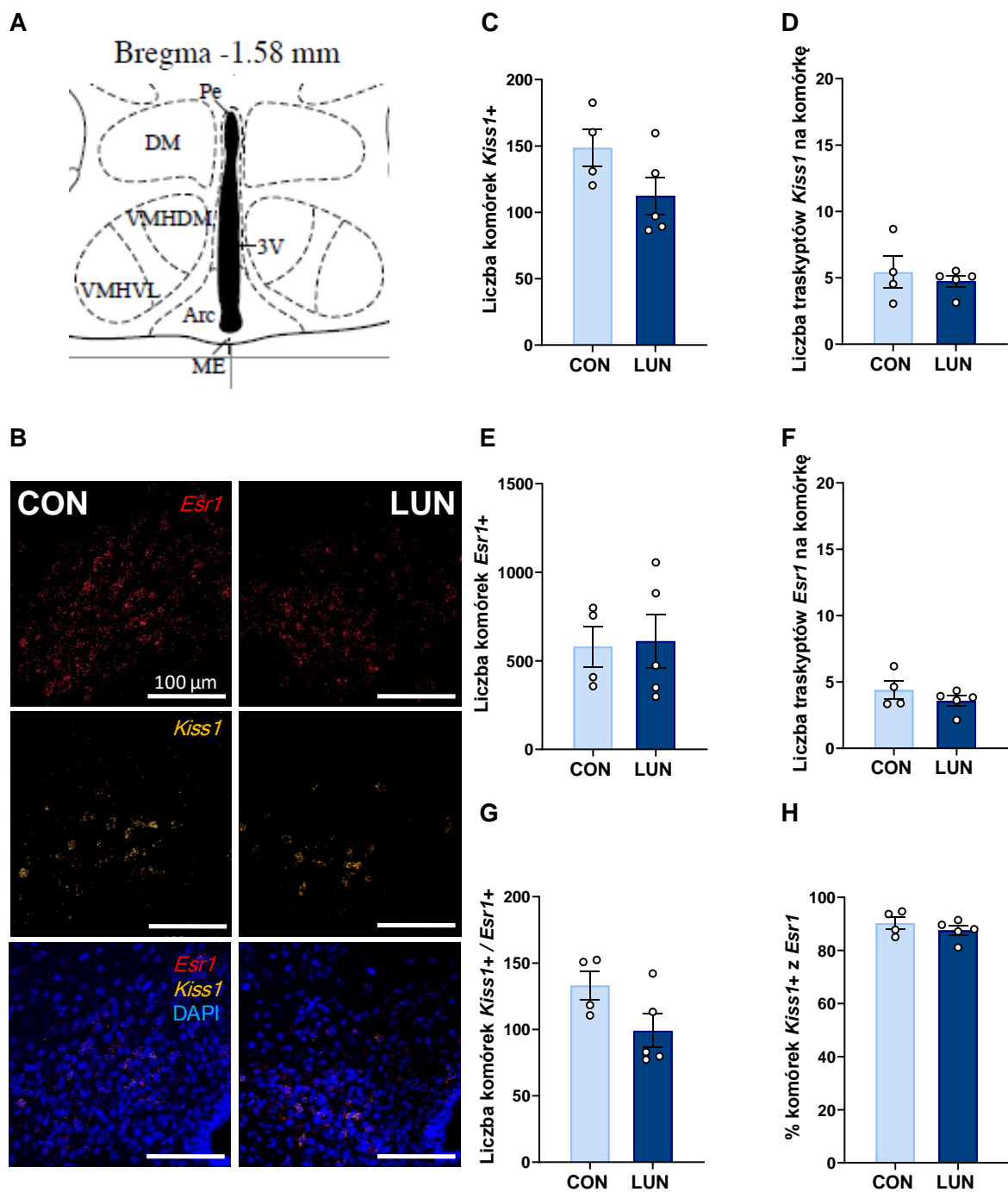
Ze względu na heterogenną budowę ARC oraz zróżnicowany rozkład komórek *Kiss1+* oraz *Esr1+* w jego obrębie, obszar ten podzielono na trzy podregiony: rARC (ang. *rostral* ARC), mARC (*middle* ARC) oraz cARC (*caudal* ARC). Również przy takim podejściu analitycznym, nie wykryto istotnych różnic w ekspresji badanych genów między grupami (Ryc. 4.32 – B-E).



Ryc. 4.30 Przestrzenna ekspresja *Kiss1* oraz *Esr1* w AVPV/PeN u 21-dniowych samic pokolenia F1. (A) Schemat z atlasu Paxinosa i Franklina (Paxinos i Franklin, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2012) ilustrujący obszar wybrany do analizy. (B) Przykładowe obrazy mikroskopowe fragmentu AVPV z lokalizacją badanych transkryptów; obiektyw 40x, skala 100 μ m. Ekspresja *Kiss1*: (C) liczba komórek *Kiss1*⁺, (D) liczba transkryptów *Kiss1* na komórkę. Ekspresja *Esr1*: (E) liczba komórek dodatnich *Esr1*⁺, (F) liczba transkryptów *Esr1* na komórkę. Kolokalizacja *Kiss1* oraz *Esr1*: (G) liczba komórek *Kiss1*⁺/*Esr1*⁺, (H) odsetek komórek *Kiss1*⁺ ze współekspresją *Esr1*. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (panele C-G: test t-Studenta; panel H: test Manna-Whitneya; * $p < 0,05$).

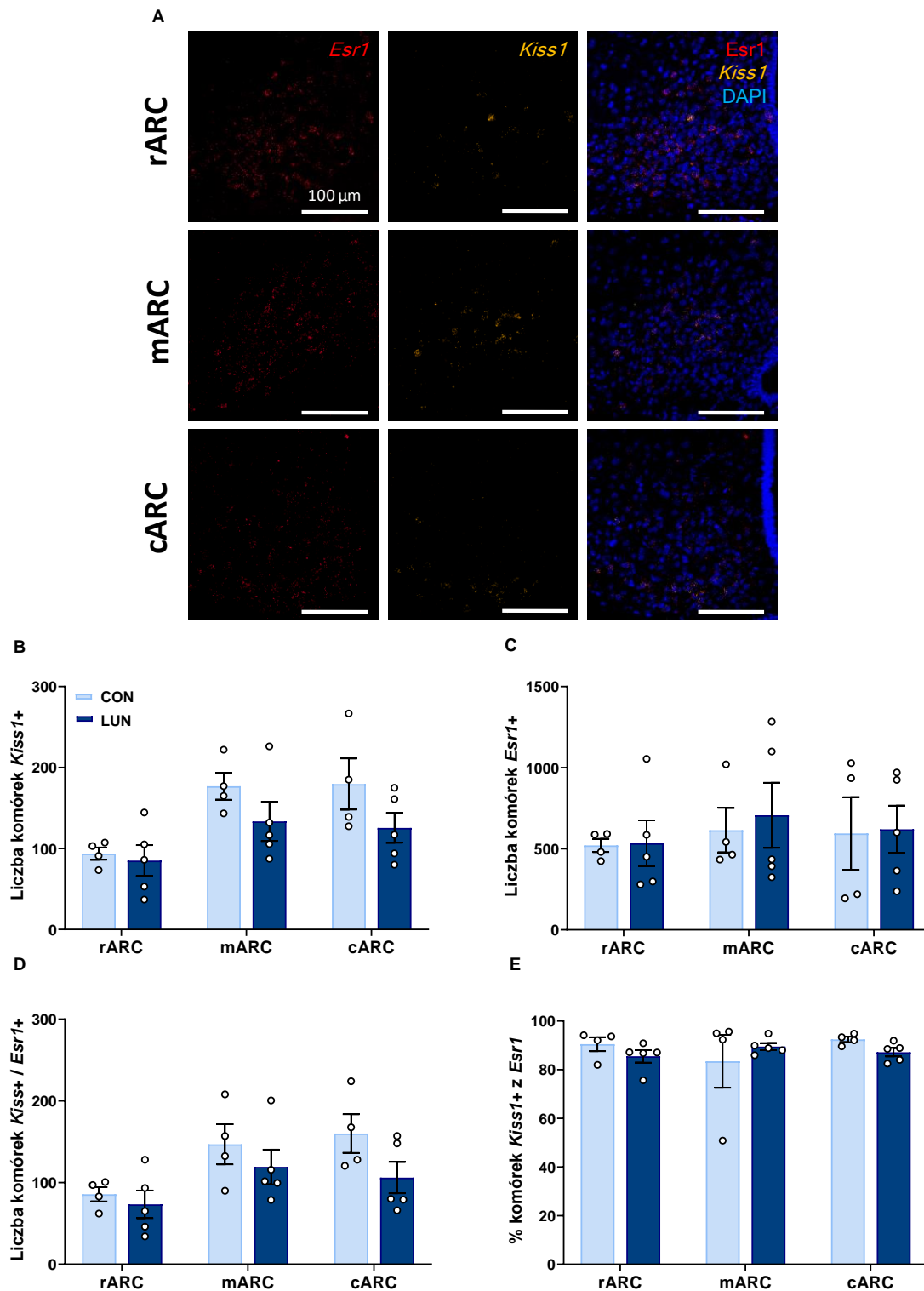
Liczebność grup (n):

CON = 4; LUN = 4



Ryc. 4.31 Przestrzenna ekspresja *Kiss1* oraz *Esr1* w ARC 21-dniowych samic pokolenia F1. (A) Schemat z atlasu Paxinosa i Franklina (Paxinos i Franklin, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2012) ilustrujący jeden z obszarów wybranych do analizy. (B) Przykładowe obrazy mikroskopowe fragmentu ARC z lokalizacją badanych transkryptów; obiektyw 40x, skala 100 μ m. Ekspresja *Kiss1*: (C) liczba komórek *Kiss*⁺, (D) liczba transkryptów *Kiss1* na komórkę. Ekspresja *Esr1*: (E) liczba komórek *Esr1*⁺, (F) liczba transkryptów *Esr1* na komórkę. Kolokalizacja *Kiss1* oraz *Esr1*: (G) liczba komórek *Kiss1*⁺/*Esr1*⁺, (H) odsetek komórek *Kiss1*⁺ ze współekspresją *Esr1*. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (test t-Studenta).

Liczebność grup (n):
 CON = 4; LUN = 5



Ryc. 4.32 Przestrzenna ekspresja *Kiss1* oraz *Esr1* w różnych obszarach przekroju ARC u samic F1 w 21 dniu życia. (A) Przykładowe obrazy mikroskopowe z lokalizacją badanych transkryptów w trzech wyodrębnionych podregionach ARC; obiektyw 40x, skala 100 μm . Przestrzenna ekspresja transkryptów: (B) liczba komórek *Kiss1*+, (C) liczba komórek *Esr1*+, (D) liczba komórek *Kiss1*+/*Esr1*+, (E) odsetek komórek *Kiss1*+ ze współekspresją *Esr1*. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Śidaka dla porównań wielokrotnych).

Liczebność grup (n):

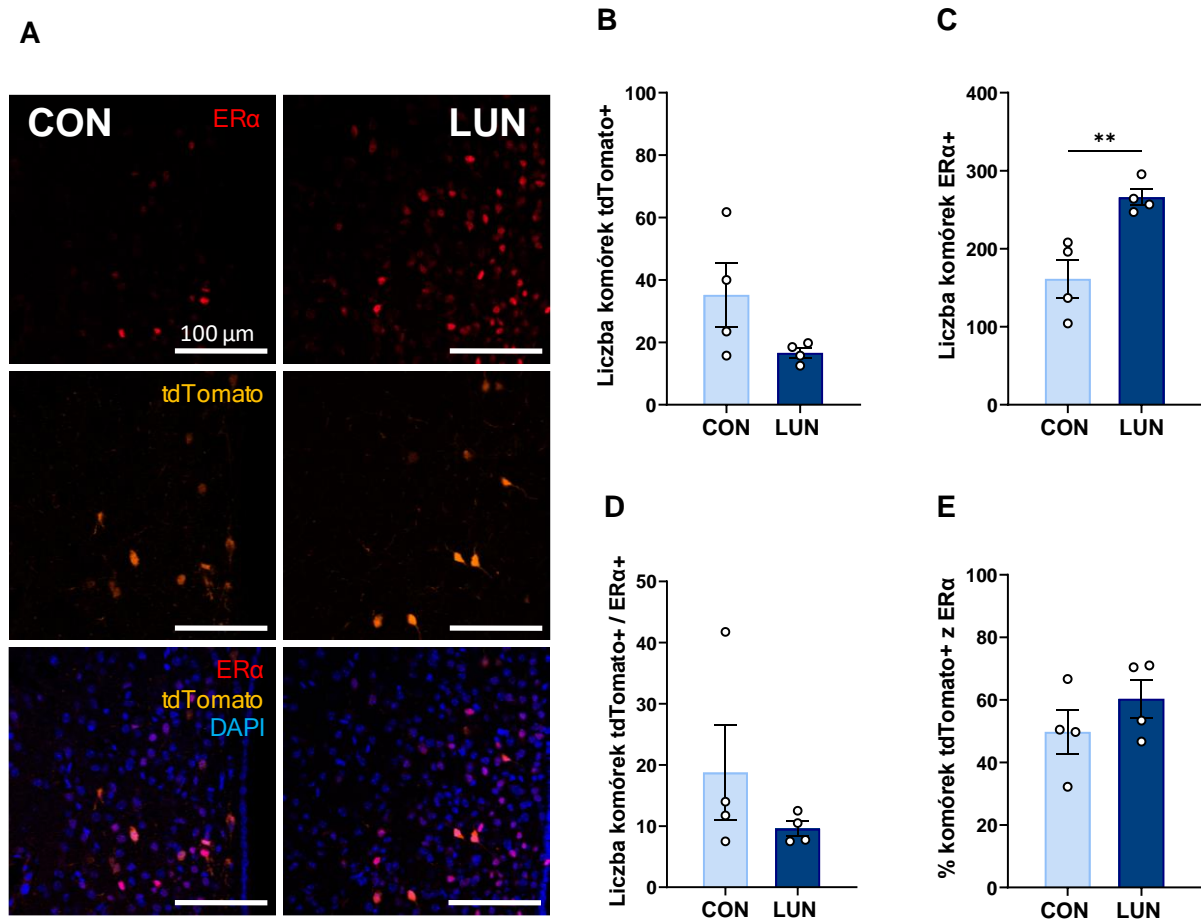
CON = 4; LUN = 5

4.4.2 Przestrzenny rozkład neuronów kisspeptynowych i ER α

Z uwagi na fakt, że zmiany na poziomie transkryptów nie zawsze odzwierciedlają stan funkcjonalny komórek, zdecydowano się również na zwizualizowanie białek kodowanych przez badane geny. Do wizualizacji neuronów kisspeptynowych wykorzystano myszy Kiss^{CreROSA26} z ekspresją białka fluorescencyjnego tdTomato (tdTomato+) w komórkach produkujących kisspeptynę, natomiast w przypadku ER α (ER α +) zastosowano barwienie immunofluorescencyjne.

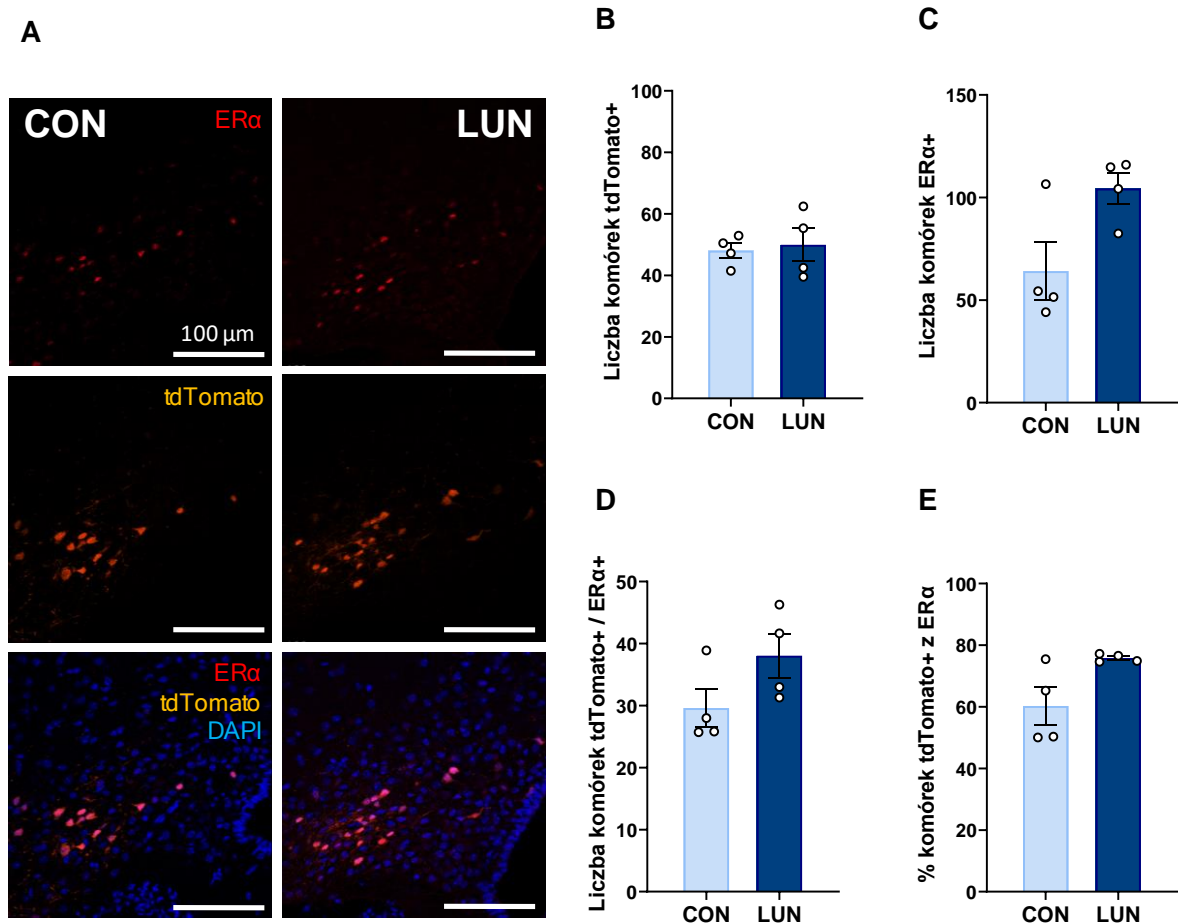
Nie stwierdzono różnic w liczbie neuronów kisspeptynowych w AVPV/PeN (Ryc. 4.33 – B), natomiast liczba komórek ER α + była wyższa w grupie LUN w porównaniu do CON ($p = 0,0079$, Ryc. 4.33 – C). Nie stwierdzono także różnic w zakresie współekspresji obu białek (Ryc. 4.33 – D-E). W ARC nie zaobserwowano zmian w ekspresji TdTomato i ER α oraz współekspresji analizowanych białek (Ryc. 4.34 – B-E). W analizie trzech podregionów ARC (rARC, mARC, cARC) odnotowano wyraźny wzrost liczby neuronów kisspeptynowych ER α + w cARC samic LUN (vs. CON; $p = 0,0307$; Ryc. 4.35 – D).

Oceny przestrzennego rozkładu komórek tdTomato+ oraz ER α + dokonano także u dojrzałych płciowo samic, aby ocenić, czy zmiany zaobserwowane przed dojrzewaniem płciowym utrzymują się w dorosłości. Zarówno w AVPV/PeN, jak i ARC nie odnaleziono żadnych różnic między grupami CON i LUN (Ryc. 4.36 – A-D; Ryc. 4.37 – A-D). Także w przypadku podziału ARC na trzy podregiony nie stwierdzono istotnych różnic (Ryc. 4.38).



Ryc. 4.33 Charakterystyka neuronów kisspeptynowych (tdTomato+) AVPV/PeN u samic z pokolenia F1 w 21 dniu życia. (A) Przykładowe obrazy mikroskopowe fragmentu AVPV z lokalizacją neuronów tdTomato+ oraz komórek ERα+; obiektyw 40x, skala 100 μm. Ekspresja badanych białek: (B) liczba komórek tdTomato+, (C) liczba komórek ERα+. Kolokalizacja tdTomato oraz ERα: (D) liczba komórek tdTomato+/ERα+, (E) odsetek komórek tdTomato+ ze współekspresją ERα. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test t-Studenta; **p < 0,01).

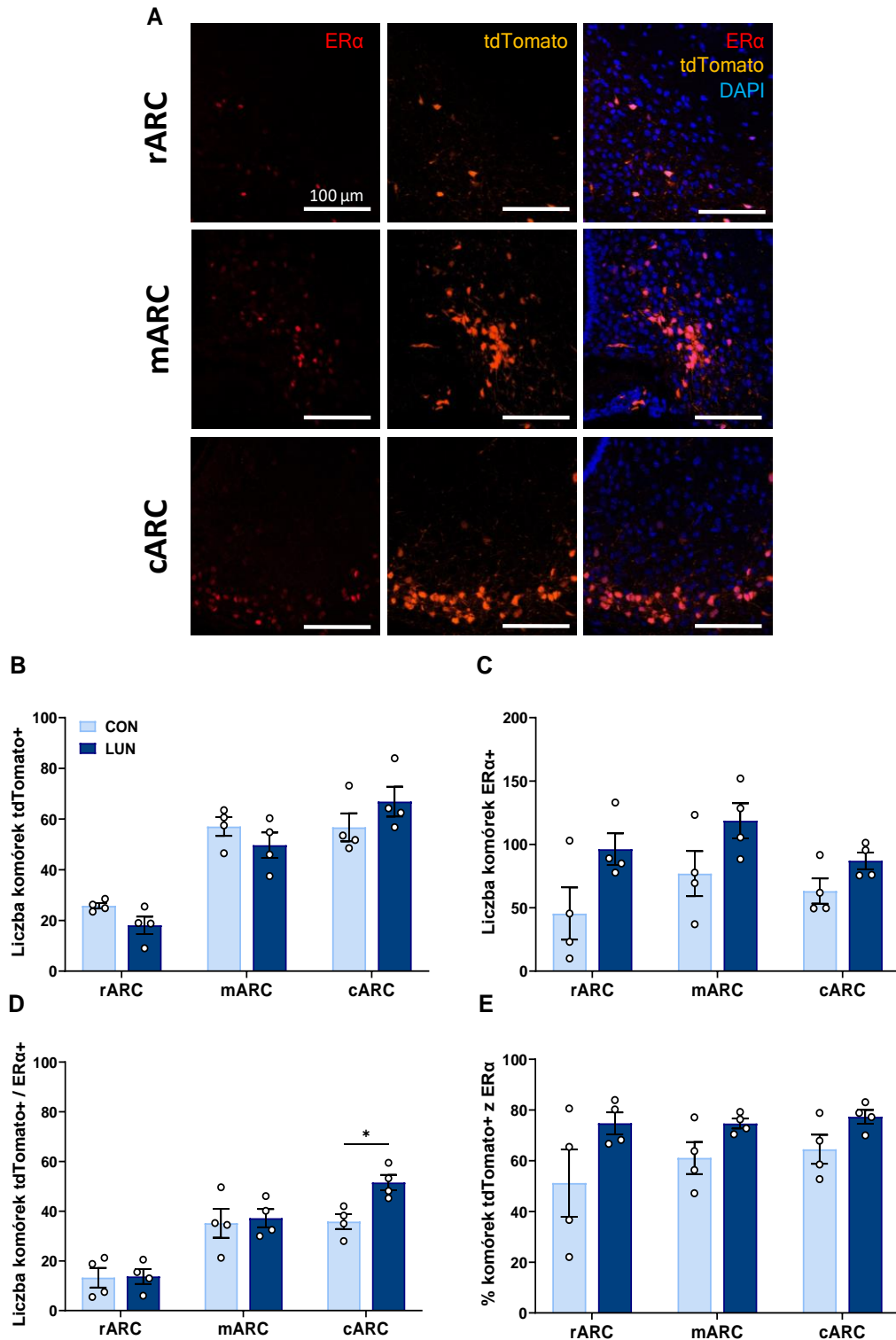
Liczebność grup (n):
 CON = 4; LUN = 4



Ryc. 4.34 Charakterystyka neuronów kisspeptynowych (tdTomato+) ARC u samic z pokolenia F1 w 21 dniu życia. (A) Przykładowe obrazy mikroskopowe fragmentu ARC z lokalizacją neuronów tdTomato+ oraz komórek ERα+; obiektyw 40x, skala 100 μm. Ekspresja badanych białek: (B) liczba komórek tdTomato+, (C) liczba komórek ERα+. Kolokalizacja tdTomato oraz ERα: (D) liczba komórek tdTomato+/ERα+, (E) odsetek komórek tdTomato+ ze współekspresją ERα. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Brak istotnych różnic między grupami (panele B i D: test t-Studenta; panele C i E: test Manna-Whitneya).

Liczebność grup (n):

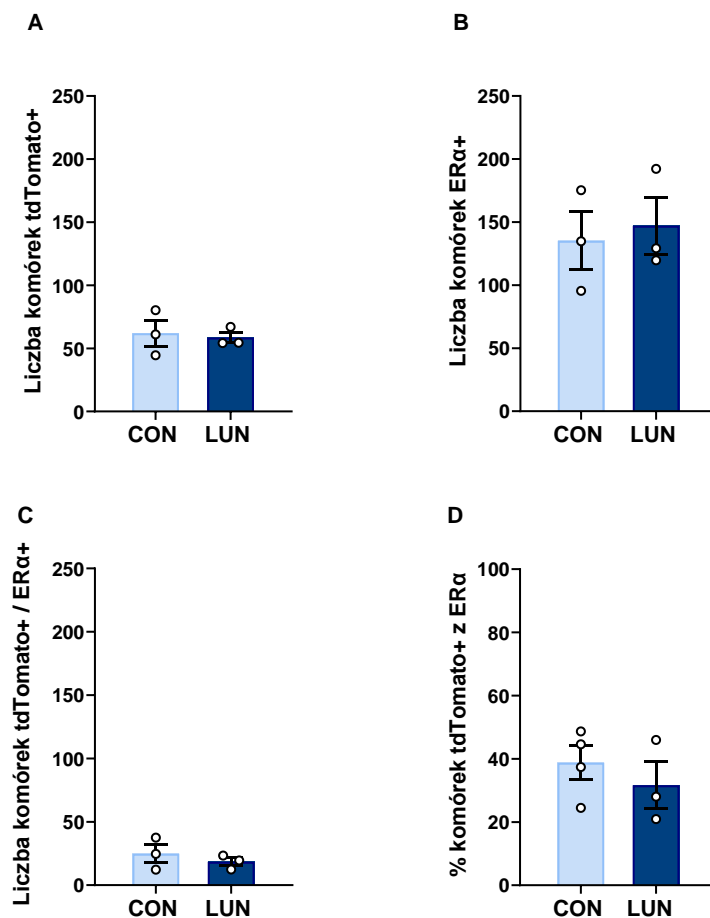
CON = 4; LUN = 4



Ryc. 4.35 Charakterystyka neuronów kisspeptynowych (tdTomato+) w trzech regionach ARC u samic z pokolenia F1 w 21 dniu życia. (A) Przykładowe obrazy mikroskopowe z lokalizacją neuronów tdTomato+ oraz komórek ERα+ w trzech wyodrębnionych podregionach ARC; obiektyw 40x, skala 100 μm. Ekspresja badanych białek: (B) liczba komórek tdTomato+, (C) liczba komórek ERα+. Kolokalizacja tdTomato oraz ERα: (D) liczba komórek tdTomato+/ERα+, (E) odsetek komórek tdTomato+ ze współekspresją ERα. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Šidaka dla porównań wielokrotnych; * $p < 0,05$).

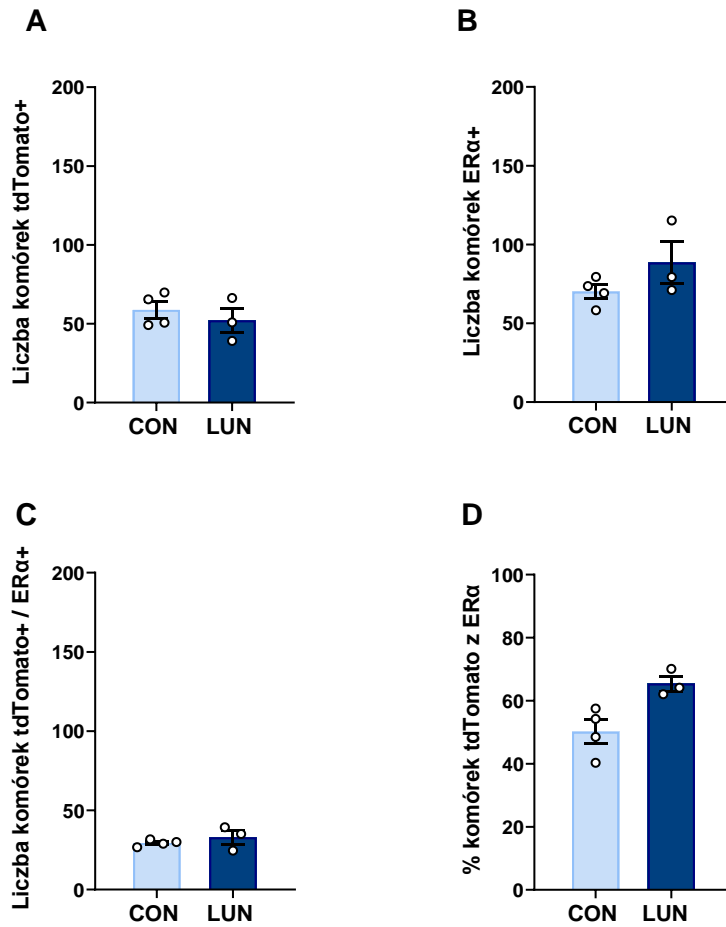
Liczebność grup (n):

CON = 4; LUN = 4



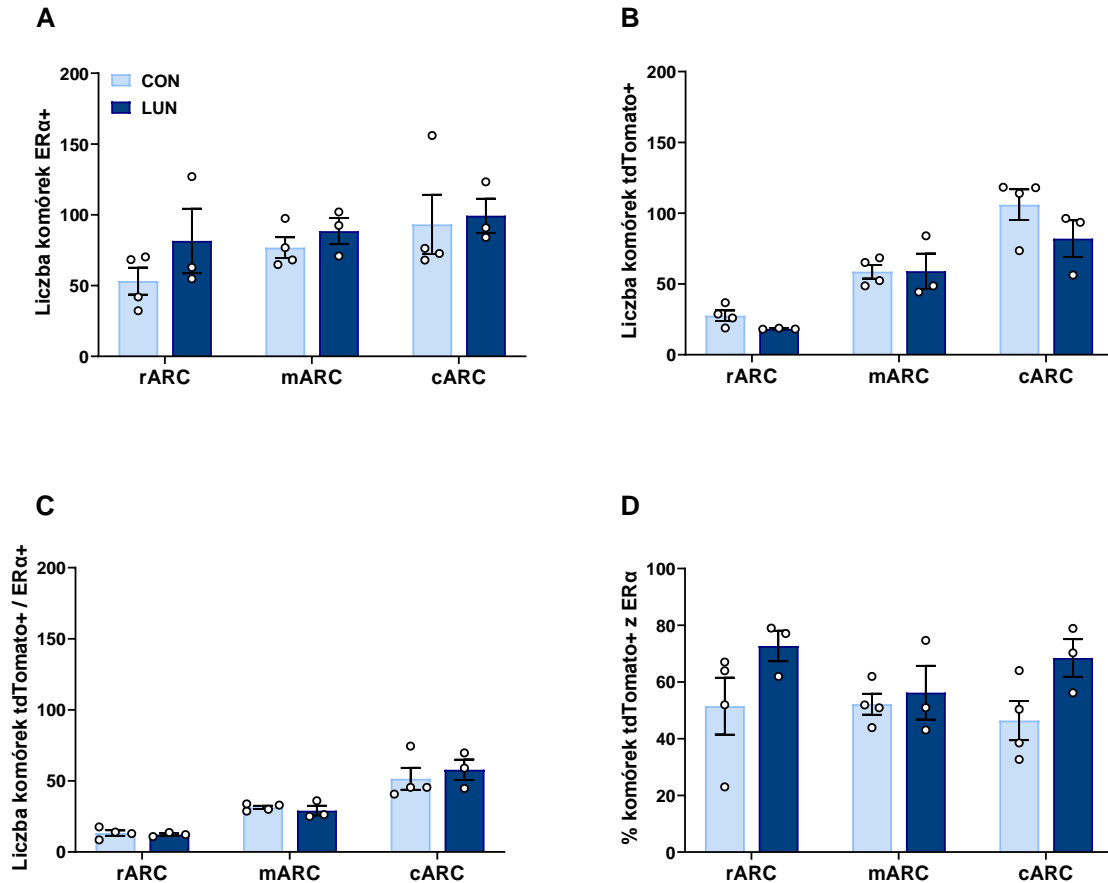
Ryc. 4.36 Charakterystyka neuronów kisspeptynowych (tdTomato+) AVPV/PeN u dojrzałych płciowo samic z pokolenia F1. Ekspresja badanych białek: (A) liczba komórek tdTomato+, (B) liczba komórek ERα+. Kolokalizacja tdTomato oraz ERα: (C) liczba komórek tdTomato+/ERα+. (D) odsetek komórek tdTomato+ ze współekspresją ERα. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (test Manna-Whitneya).

Liczebność grup (n):
 CON = 3; LUN = 3



Ryc. 4.37 Charakterystyka neuronów kisspeptynowych (tdTomato+) ARC u dojrzałych płciowo samic z pokolenia F1. Ekspresja badanych białek: (A) liczba komórek tdTomato+, (B) liczba komórek ERα+. Kolokalizacja tdTomato oraz ERα: (C) liczba komórek tdTomato+/ERα+, (D) odsetek komórek tdTomato+ ze współekspresją ERα. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (test Manna-Whitneya).

Liczebność grup (n):
 CON = 4; LUN = 3



Ryc. 4.38 Charakterystyka neuronów kisspeptynowych (tdTomato+) w trzech regionach ARC u dojrzałych płciowo samic z pokolenia F1. Ekspresja badanych białek: (A) liczba komórek tdTomato+, (B) liczba komórek ER α +. Kolokalizacja tdTomato oraz ER α : (C) liczba komórek tdTomato+/ER α +, (D) odsetek komórek tdTomato+ ze współekspresją ER α . Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (dwuczynnikowa ANOVA z testem *post hoc* Šidaka dla porównań wielokrotnych).

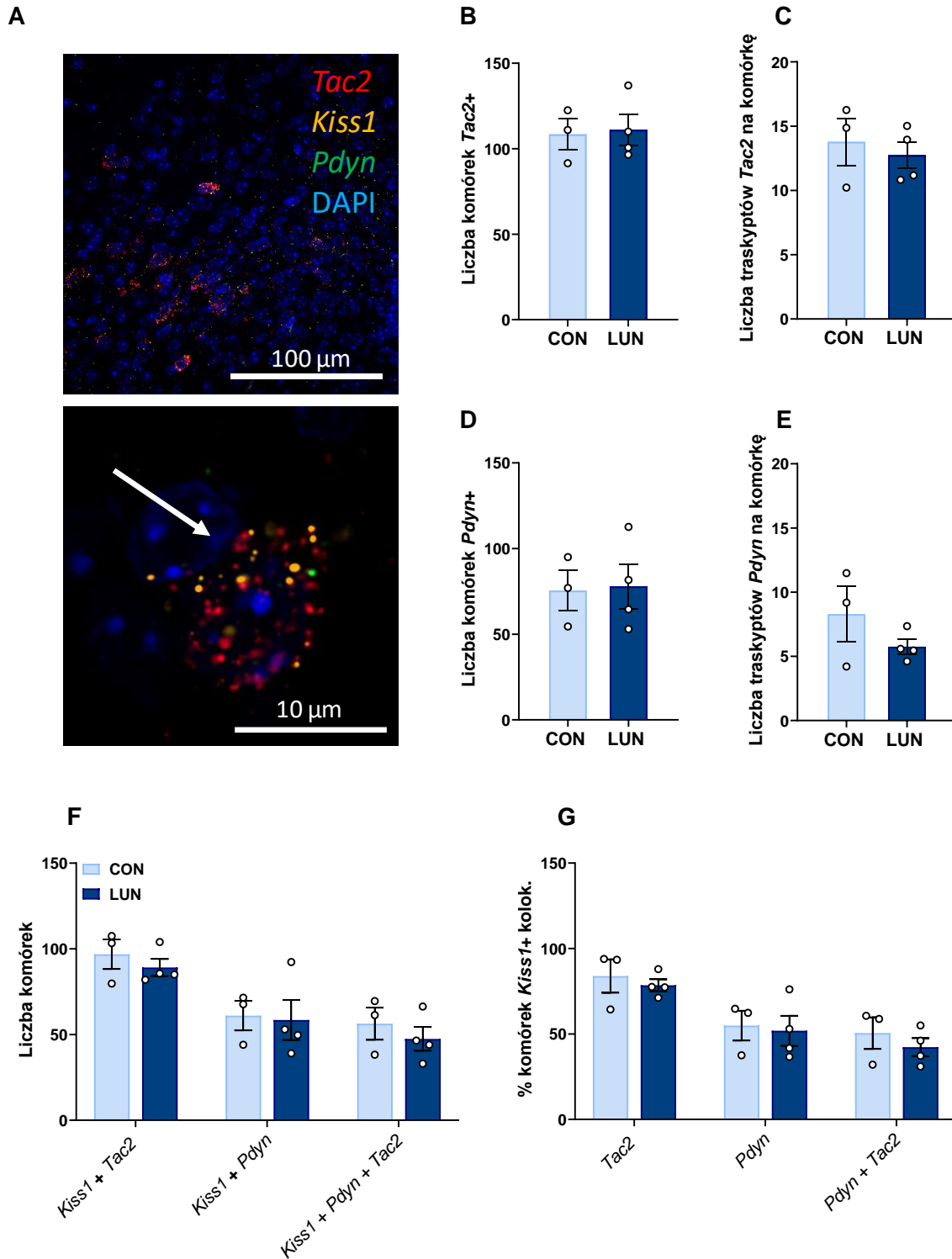
Liczebność grup (n):

CON = 4; LUN = 3

4.4.3 Charakterystyka neuronów KNDy

Obserwowane zmiany w składzie ciała i poziomie hormonów osi sugerowały, że niedobór składników odżywczych na wczesnym etapie życia wpływa również na neurony KNDy w ARC. W celu weryfikacji tych przypuszczeń zastosowano technikę hybrydyzacji *in situ* u samic w 21 dniu życia, aby zwizualizować transkrypty *Kiss1*, *Tac2* i *Pdyn*, będące markerami neuronów KNDy. Ze względu na znikomą ekspresję *Pdyn* w skrajnych rejonach ARC, analizę ograniczono do odcinka ARC obejmującego obszar od bregma -1.58 do -2.18.

U trzytygodniowych samic CON i LUN pokolenia F1 nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie komórek wykazujących ekspresję *Tac2* i *Pdyn*, ani w zagęszczeniu tych transkryptów w obrębie ARC (Ryc. 4.39 – B-E). Analiza współekspresji wykazała, że niemal 100% komórek pozytywnych dla *Kiss1* wykazywało jednocześnie ekspresję *Tac2*, natomiast w przypadku *Pdyn* odsetek ten był niższy i wynosił około 60% zarówno w grupie CON, jak i LUN (Ryc. 4.39 – G). Nie zaobserwowano także różnic między grupami w liczbie komórek wykazujących ekspresję trzech analizowanych transkryptów (Ryc. 4.39 – F), ani w odsetku neuronów *Kiss1*+, które wykazywały współekspresję zarówno *Tac2*, jak i *Pdyn* (Ryc. 4.39 – G).



Ryc. 4.39 Charakterystyka neuronów KNDy w ARC u samic z pokolenia F1 w 21 dniu życia. (A) Przykładowe obrazy mikroskopowe fragmentu ARC przedstawiające ekspresję markerów neuronów KNDy; białą strzałką oznaczono komórkę *Kiss1*+/*Tac2*+/*Pdyn*+; obiektyw 40x, skala 100 μ m lub 10 μ m. (B) Liczba komórek *Tac2*+. (C) Liczba transkryptów *Tac2* na komórkę. (D) Liczba komórek *Pdyn*+. (E) Liczba transkryptów *Pdyn* na komórkę. (F-G) Kolokalizacja *Kiss1* z pozostałymi markerami neuronów KNDy – liczba komórek (F) oraz odsetek komórek (G). Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Brak istotnych statystycznie różnic między grupami (panele B-D: test Manna-Whitneya; panele F-G: test ANOVA z testem *post hoc* Śidaka dla porównań wielokrotnych).

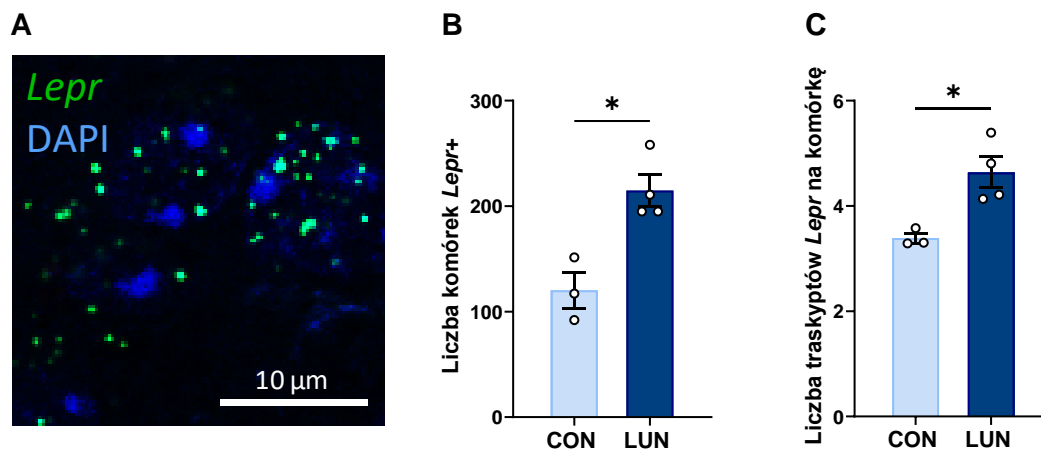
Liczebność grup (n):
CON = 3; LUN = 4

4.4.4 Ekspresja *Lepr* w jądrze łukowatym podwzgórza i funkcjonalna odpowiedź neuronalna na leptynę

4.4.4.1 Ekspresja *Lepr* w ARC

Ze względu na zwiększoną ekspresję receptora leptyny (*Lepr*) w podwzgórzu samic LUN wykazaną w pracy Kaczmarek i in. (2016), której towarzyszył obniżony poziom leptyny w osoczu samic w 21 dniu życia, postanowiono zbadać czy do nadekspresji *Lepr* dochodzi w obrębie komórek zlokalizowanych w ARC.

Analiza ekspresji *Lepr* w ARC ujawniła u samic LUN nie tylko zwiększoną liczbę komórek *Lepr*⁺ ($p = 0,0286$; Ryc. 4.40 – B), ale również większą liczbę transkryptów *Lepr* przypadających na komórkę *Lepr*⁺ ($p = 0,0286$; Ryc. 4.40 – C).



Ryc. 4.40 Ekspresja *Lepr* w ARC u samic z pokolenia F1 w 21 dniu życia. (A) Przykładowy obraz mikroskopowy fragmentu ARC przedstawiający komórki z ekspresją *Lepr*; powiększenie 40x, skala 10 μm. (B) Liczba komórek *Lepr*⁺. (C) Liczba transkryptów *Lepr* na komórkę. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test Manna-Whitneya; * $p < 0,05$).

Liczebność grup (n):

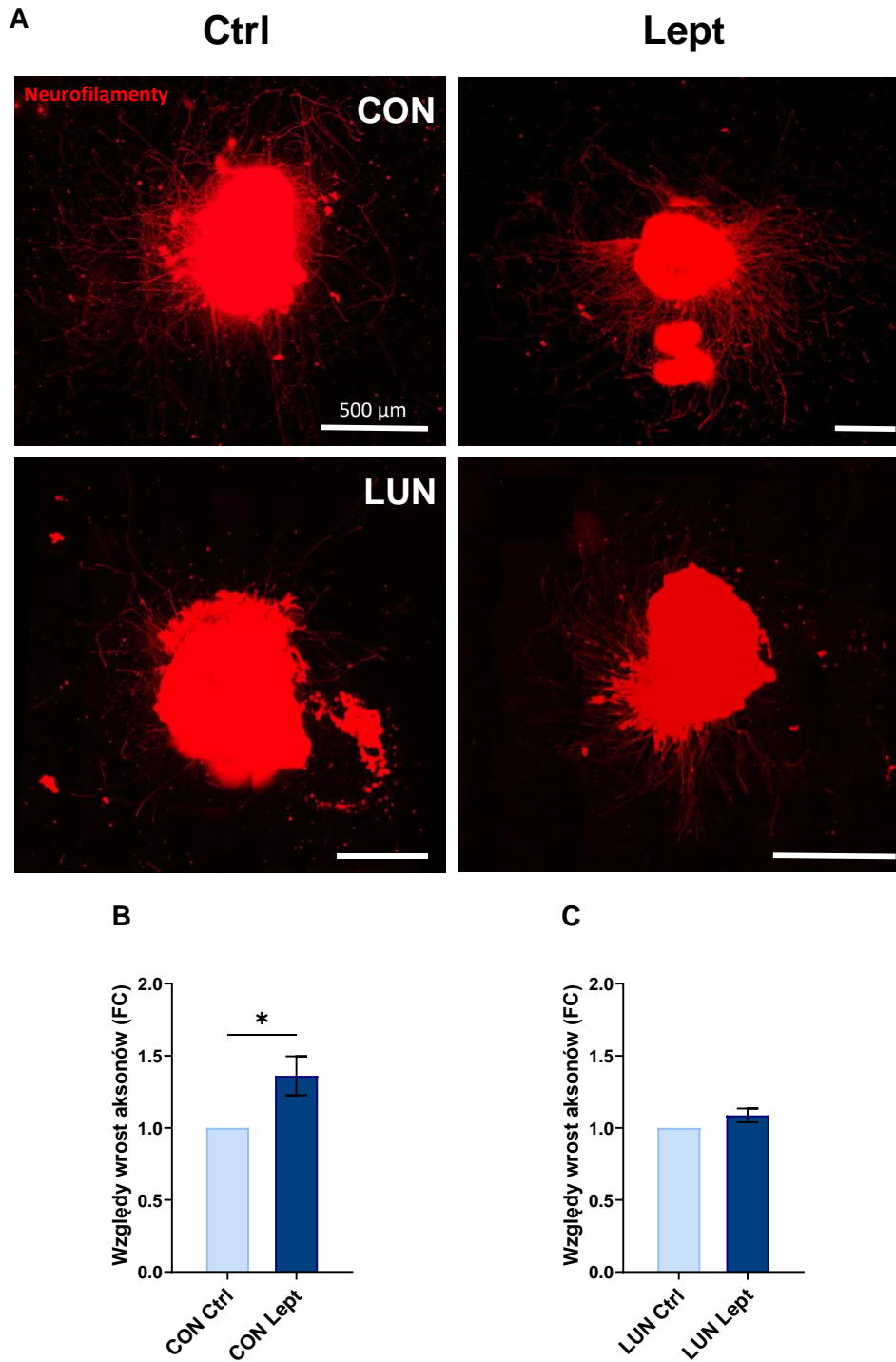
CON = 3; LUN = 4

4.4.4.2 Wzrost aksonów

Podczas rozwoju postnatalnego w okolicy PND10 (najczęściej między PND8 a PND12) w osoczu myszy obserwuje się podwyższone stężenie leptyny (Ahima i in., 1997; Skowronski i in., 2022). Uważa się, że odpowiedni poziom leptyny w tym okresie jest niezbędny do tworzenia połączeń neuronalnych w obrębie podwzgórza (Bouret i in., 2004b). Natomiast gdy podaż składników odżywczych jest ograniczona, poziom leptyny w osoczu jest zdecydowanie niższy niż w grupie zwierząt bez restrykcji (Kozak i in., 2010; Skowronski i in., 2022).

W niniejszej pracy założono hodowle fragmentów ARC pobranych od samic *Kiss*^{CreROSA26} w PND8 – tuż przed dniem, gdy leptyna w osoczu osiąga najwyższy poziom w okresie postnatalnym – by sprawdzić czy wczesny stres żywieniowy modyfikuje odpowiedź wzrostową neuronów na ten hormon. Leptyna stymulowała wzrost całej puli aksonów neuronów ARC u zwierząt CON (vs. Ctrl $p = 0,0476$; Ryc. 4.41 – B). Natomiast, efekt ten nie występował u samic LUN (Ryc. 4.41 – C).

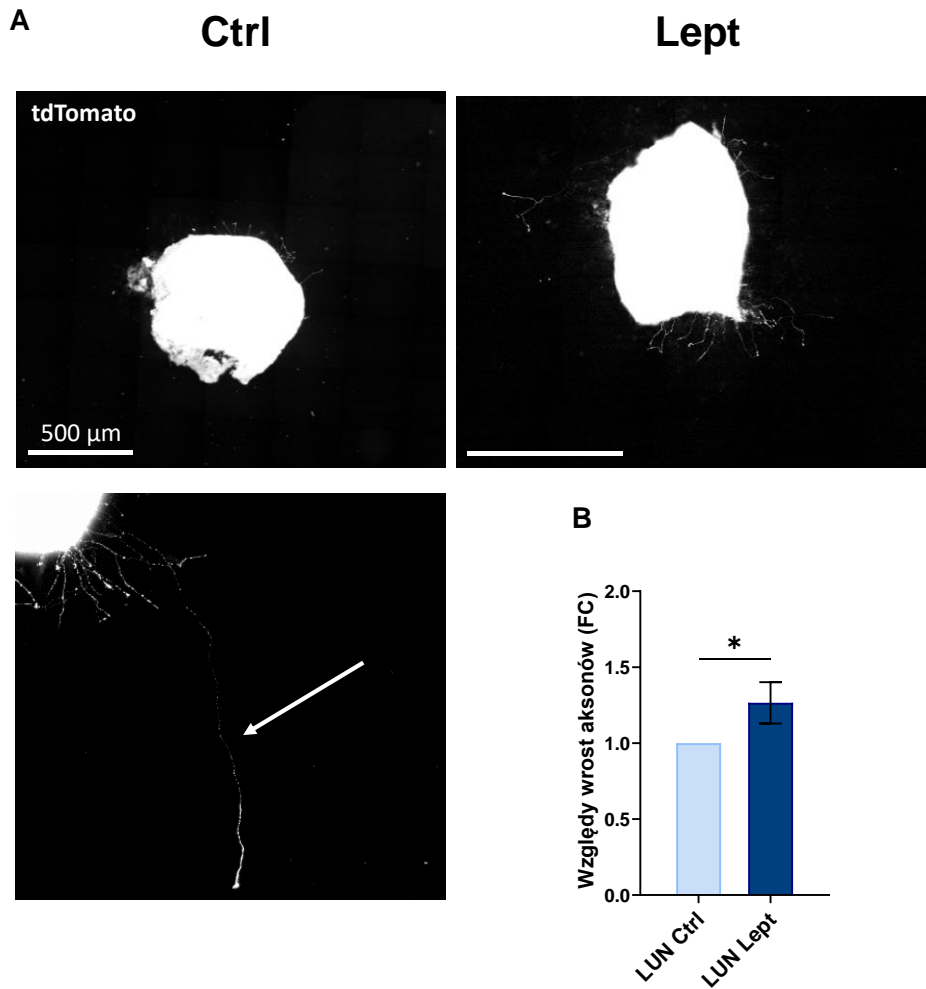
U samic CON wzrost aksonów neuronów kisspeptynowych ARC był na tyle ograniczony, że uniemożliwił wiarygodną analizę ilościową, podczas gdy u samic LUN taką analizę przeprowadzono. W odróżnieniu od wyników uzyskanych dla całej populacji neuronów ARC (zwizualizowanych barwieniem neurofilamentów), leptyna stymulowała wzrost aksonów z ekspresją tdTomato w grupie LUN (vs. Ctrl $p = 0,0286$; Ryc. 4.42 – B).



Ryc. 4.41 Wzrost aksonów neuronów ARC w odpowiedzi na leptynę. (A) Przykładowe zdjęcia mikroskopowe obrazujące wzrost aksonów w odpowiedzi na zadane warunki hodowli: Lept – leptyna (100 ng/mL), Ctrl – kontrola (medium bez dodatków); mozaika (stitching), obiektyw 25x, skala 500 μm. (B) Wzrost aksonów u samic CON. (C) Wzrost aksonów u samic LUN. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test Manna-Whitneya; * $p < 0,05$).

Liczebność grup (n):

CON, LUN Ctrl = 6; CON, LUN Lept = 6



Ryc. 4.42 Wzrost aksonów neuronów kisspeptynowych (tdTomato+) ARC samic LUN w odpowiedzi na leptynę. (A) Przykładowe zdjęcia mikroskopowe obrazujące wzrost aksonów wykazujących ekspresję kisspeptyny (tdTomato+) w odpowiedzi na zadane warunki hodowli: Lept – leptyna (100 ng/mL), Ctrl – kontrola (medium bez dodatków); mozaika (stitching), obiektyw 25x, skala 500 μm . (B) Wzrost aksonów u samic LUN. Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM. Gwiazdkami oznaczono istotne różnice między grupami (test Manna-Whitneya; $*p < 0,05$).

Liczebność grup (n):

LUN Ctrl = 4; LUN Lept = 4

5. Dyskusja

Stan odżywienia matki w czasie ciąży i laktacji odgrywa zasadniczą rolę w programowaniu zdrowia potomstwa, a jego skutki mogą rozciągać się na kolejne generacje. Zarówno niedobór, jak i nadmiar składników odżywczych obecnych we krwi ciężarnej oraz w mleku matki, przekazywanych potomstwu, mogą prowadzić do trwałych modyfikacji struktury i funkcji tkanek i organów. Zmiany te mogą utrwalać się i podlegać transmisji pomiędzy pokoleniami między innymi poprzez mechanizmy epigenetyczne, co wpisuje się w koncepcję programowania żywieniowego. Dogłębne poznanie mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska pozwoli lepiej zrozumieć, w jaki sposób żywienie matki kształtuje długofalowe trajektorie zdrowotne potomstwa, ze szczególnym uwzględnieniem układu rozrodczego w kontekście obserwowanego wzrostu częstości niepłodności na świecie.

Dotychczas stosunkowo dobrze udokumentowano wpływ otyłości matczynej na zdrowie reprodukcyjne córek – od zaburzeń profilu hormonalnego po zmiany metaboliczne w obrębie komórek jajowych (Schroeder i in., 2013; Saben i in., 2016; Xhonneux i in., 2024). Znacznie mniej danych dotyczy natomiast skutków niedożywienia matki, zwłaszcza w okresie laktacji, który u gryzoni stanowi krytyczne okno rozwojowe dla kształtowania neuroendokrynnych sieci podwzgórzowych regulujących funkcje rozrodcze. Rozwój struktur podwzgórza przebiega w znacznym stopniu postnatalnie i jest szczególnie wrażliwy na zakłócenia środowiska, w tym związane z odżywianiem, co może prowadzić do długofalowych konsekwencji metabolicznych i rozrodczych (Bouret i in., 2004a; Clarkson i in., 2009; Castellano i in., 2011; Bouret i in., 2012).

W niniejszej pracy skoncentrowano się na wpływie niedożywienia matki podczas laktacji na funkcjonowanie osi HPG u potomstwa, w ujęciu wielopokoleniowym. Uwzględniono również masę i skład ciała, jako zmienne ściśle powiązane z dojrzewaniem płciowym i płodnością. Analiza objęła dwa zasadnicze poziomy organizacji osi HPG, skupiając się przede wszystkim na ocenie struktur podwzgórzowych, profilu hormonalnym, morfologii i funkcji jajników, a także jakości komórki jajowej, rozpatrywanej jako jej kompetencję metaboliczną warunkującą powodzenie ciąży.

Funkcjonowanie osi HPG, na poziomie hormonalnym, morfologii oraz transkryptomu jajnika, oceniono u samic pokolenia F1 w 21 dniu życia (tuż po zakończeniu restrykcji pokarmowej i odstawieniu od matek), a także w wieku dorosłym. Analogiczne analizy wykonano u samic pokolenia F2 w 21 dniu życia. Dodatkowo, u dorosłych samic obu pokoleń dokonano oceny metabolicznej funkcji komórek jajowych, która w znacznym stopniu determinuje powodzenie zapłodnienia oraz prawidłowy rozwój zarodka. Uwzględniono również ocenę potencjału rozrodczego samic. Powyższe podejście pozwoliło na kompleksową charakterystykę efektów programowania w okresie wczesnego rozwoju postnatalnego oraz ocenę możliwości ich przekazywania do kolejnego pokolenia.

Druga część pracy dotyczyła podwzgórzowych sieci regulujących funkcjonowanie osi HPG, ze szczególnym uwzględnieniem neuronów kisspeptynowych, które stanowią kluczowy element neuroendokrynnego kontroli rozrodu. Układ kisspeptynowy jest wrażliwy na zmiany metaboliczne już na wczesnych etapach rozwoju, a indukowane wówczas zaburzenia mogą utrzymywać się w dorosłości, prowadząc do dysfunkcji rozrodczych (Navarro, 2022). W związku z tym analizie poddano zmiany ekspresji kisspeptyny oraz receptora estrogenowego (ESR α) w odpowiedzi na wczesny stres żywieniowy w dwóch kluczowych dla regulacji

rozrodu ośrodkach podwzgórza samic: AVPV/PeN oraz ARC. Dalszą analizę skoncentrowano na ARC, stanowiącym centralny ośrodek integrujący sygnały metaboliczne z regulacją funkcji rozrodczych. Oceniono tu populację neuronów KNDy, ekspresję genu receptora leptyny (*Lepr*) oraz wrażliwość neuronów ARC na leptynę w okresie spodziewanego wzrostu tego hormonu w osoczu w pierwszych tygodniach życia (Ahima i in., 1997). Ze względu na złożoność i czasochłonność analiz mających na celu lokalizację białek i transkryptów, zakres tych badań na obecnym etapie ograniczono do pokolenia F1.

5.1. Niedożywienie matki w czasie laktacji skutkuje zmianami składu ciała u potomstwa

Główne obserwacje dotyczące samic pokolenia F1 w zakresie masy i składu ciała w odpowiedzi na niedożywienie matki w okresie laktacji obejmowały wyraźne obniżenie masy ciała, zarówno tłuszczowej, jak i beztłuszczowej, w 21 dniu życia, utrzymywanie się niższej masy ciała przez cały okres obserwacji do 70 dnia życia, ograniczenie masy tkanki tłuszczowej w okresie okołopokwitaniowym oraz redukcję beztłuszczowej masy ciała, obserwowaną również po osiągnięciu pełnej dojrzałości płciowej.

Uzyskane wyniki wskazują, że restrykcja żywieniowa matek podczas laktacji programuje fenotyp potomstwa, sprzyjając utrzymywaniu niższej masy ciała. Podobne obserwacje opisano wcześniej – ograniczenie podaży białka w diecie karmiących matek skutkowało obniżeniem masy ciała u potomstwa (Fagundes i in., 2007; Pinheiro i in., 2008), a także spadkiem całkowitej i trzewnej tkanki tłuszczowej, bez istotnych zmian w ilości spożywanego pokarmu u dorosłych osobników (Fagundes i in., 2007). Kozak i współpracownicy (2010), stosując model niedożywienia w okresie laktacji identyczny z wykorzystanym w niniejszej pracy, również obserwowali obniżenie masy ciała oraz redukcję masy tłuszczowej i beztłuszczowej. Co istotne, podobnie jak w badaniach Fagundes'a i współpracowników (2007), nie stwierdzili różnic w ilości spożywanego pokarmu po ustąpieniu wczesnego deficytu żywieniowego, także po przejściu zwierząt na dietę wysokotłuszczową. Wyniki te wskazują, że obserwowane zmiany nie wynikają z ograniczenia poboru energii, lecz stanowią efekt trwałego przeprogramowania gospodarki energetycznej w okresie laktacji.

Warto podkreślić znaczenie i subtelność okna czasowego, w którym występował stres żywieniowy w zastosowanym modelu. Podczas gdy restrykcja żywieniowa matki w okresie prenatalnym często prowadzi do zaprogramowania fenotypu sprzyjającego zwiększonemu odkładaniu tkanki tłuszczowej u potomstwa w dorosłości, zwłaszcza w warunkach późniejszej nadpodaży energii, restrykcja ograniczona wyłącznie do okresu laktacji wywołuje odmienny efekt programujący. W takim modelu zazwyczaj obserwuje się trwałe ograniczenie magazynowania tkanki tłuszczowej oraz brak typowych cech zespołu metabolicznego w wieku dorosłym (Pinheiro i in., 2008; Garcia i in., 2011; de Oliveira i in., 2012).

Etap laktacji u matek zbiega się z okresem intensywnego odkładania białej tkanki tłuszczowej u potomstwa, a modyfikacje dostępności mleka matki lub jego składu mogą mieć długotrwałe konsekwencje dla liczby i funkcji adipocytów. U szczurów potomstwo niedożywionych podczas laktacji samic ma mniejsze komórki tłuszczowe i niższą zawartość tkanki tłuszczowej w dorosłości, a niekiedy również większą odporność na dietozależne odkładanie tłuszczu (Patterson in., 2010; Palou i in., 2011). W niniejszej pracy obniżona masa ciała samic w 21 dniu życia wynikała jednak nie tylko z ograniczenia masy tkanki tłuszczowej, lecz także z redukcji

beztłuszczowej masy ciała, a efekt ten utrzymywał się w wieku dorosłym. Podobne obserwacje w 21 dniu od urodzenia przedstawili Desai i współpracownicy (2003).

W kolejnym pokoleniu (F2), u potomstwa rodziców z grupy LUN (LL), stwierdzono jedynie przejściowe obniżenie zawartości tkanki tłuszczowej w 21 dniu życia, które zanikało w dorosłości. Zmiany ograniczone do jednego punktu czasowego mogą odzwierciedlać wpływ środowiska matczynego w okresie ciąży (np. poprzez zaburzenia funkcjonowania łożyska) bądź w czasie laktacji (np. poprzez przeprogramowanie funkcji wydzielniczych gruczołu mlekowego). Brak analogicznego efektu u samic z grupy LC może sugerować udział złożonej interakcji czynników matczynych i ojcowskich lub różnice w podatności na zmodyfikowane środowisko prenatalne i postnatalne. Rozstrzygnięcie znaczenia tych mechanizmów wymaga jednak dalszych badań, obejmujących między innymi precyzyjne rozdzielanie wpływu środowiska matczynego, ojcowskiego oraz potencjalnych zmian epigenetycznych w linii zarodkowej.

Co istotne, można również znaleźć doniesienia opisujące fenotypy odmienne od obserwowanych w niniejszej pracy. Pinheiro i współpracownicy (2008) wykazali, że u pokolenia F2 w modelu niedożywienia w okresie laktacji występowało zwiększenie zawartość tkanki tłuszczowej oraz hiperleptynemia. Należy jednak podkreślić, że w tym badaniu matki z pokolenia F1 były kojarzone z samcami spoza eksperymentu, a zastosowany protokół żywieniowy opierał się na ograniczeniu podaży białka (5 g/100 g pożywienia vs. 19 g/100 g w grupie kontrolnej). Mimo odmiennych efektów fenotypowych wyniki te pozostają spójne z koncepcją programowania żywieniowego i podkreślają znaczenie wczesnego okresu postnatalnego jako krytycznego okna podatnego na trwałe przeprogramowanie metabolizmu potomstwa. Obserwowane rozbieżności pomiędzy badaniami mogą wynikać z rodzaju zastosowanej restrykcyj (energetyczna vs. białkowa), różnic gatunkowych i płciowych w odpowiedzi na stres żywieniowy, a także czasu i kontekstu ekspozycji, co dodatkowo podkreśla złożoność mechanizmów programowania metabolicznego potomstwa.

5.2. Niedożywienie matki w czasie laktacji wpływa negatywnie na dojrzewanie płciowe i sukces rozrodczy potomstwa

Ograniczenie podaży energii u matek w okresie laktacji miało negatywny wpływ na dojrzewanie płciowe ich córek, prowadząc do opóźnienia zarówno otwarcia dróg rodnych, jak i wystąpienia pierwszej fazy *estrus*, podczas której powinna pojawić się pierwsza owulacja. Średnie opóźnienie dojrzewania wynosiło około 6 dni, co prawdopodobnie odzwierciedlało czas niezbędny do osiągnięcia minimalnego poziomu rezerw energetycznych umożliwiających aktywację osi HPG. Zgodnie z hipotezą „krytycznej masy ciała/tkanki tłuszczowej” (Frisch i Revelle, 1970; Frisch, 1980), osiągnięcie minimalnego progu zasobów energetycznych jest warunkiem inicjacji aktywności osi HPG, a tym samym rozpoczęcia dojrzewania płciowego.

Potomstwo z grupy LUN wykazywało także zaburzenia regularności cyklu rujowego, szczególnie w początkowym okresie, zaraz po otwarciu dróg rodnych. Choć analiza całkowitej długości wszystkich badanych cykli nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami, samice LUN osiągały regularną cykliczność o około 8 dni później niż samice kontrolne. Wyniki niniejszej pracy potwierdzają zatem, że zaburzenia równowagi energetycznej we wczesnym okresie życia mogą funkcjonalnie opóźniać zarówno proces dojrzewania płciowego, jak i osiągnięcie pełnej regularności cykli rujowych.

Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi wpływu niedożywienia matek podczas ciąży i laktacji na zdrowie potomstwa. Kaczmarek i współpracownicy (2016) także obserwowali znaczne opóźnienie otwarcia dróg rodnych u samic LUN oraz przesunięcie w czasie wystąpienia pierwszej fazy *estrus*. Podobne efekty odnotowano również w badaniach, w których redukcja kaloryczna lub ograniczenie podaży białka w diecie matek w okresie laktacji prowadziły do opóźnionego dojrzewania płciowego ich córek (da Silva Faria i in., 2004). Iyare i współpracownicy (2010) potwierdzili, że ograniczone spożycie pokarmu przez samice w okresie laktacji skutkuje przesunięciem momentu osiągnięcia dojrzałości płciowej u potomstwa. Na tle większości doniesień odmiennie wyniki uzyskano w badaniu, w którym model niedożywienia opierał się na zwiększeniu liczebności miotu (Guergolette i in., 2025); w tym przypadku nie stwierdzono zmian w parametrach reprodukcyjnych u potomstwa.

Istotnym uzupełnieniem powyższych wyników była długoterminowa ocena potencjału rozrodczego samic, prowadzona przez okres 20 tygodni. Eksperyment rozpoczęto, gdy samice miały około 3 miesiące, a zakończono w wieku około 8 miesięcy. Początkowo samice LUN regularnie zachodziły w ciążę, a liczebność miotów była porównywalna z grupą kontrolną. Z czasem ich potencjał rozrodczy wyraźnie malał – mioty były mniej liczne, a aktywność rozrodcza stopniowo wygasła, podczas gdy u samic kontrolnych utrzymywała się na stabilnym poziomie. Warto zaznaczyć, że w wieku zbliżonym do momentu rozpoczęcia eksperymentu reprodukcyjnego, hormonalna indukcja superowulacji u samic LUN nie wpływała na liczbę owulowanych oocytów w porównaniu z grupą kontrolną.

Dostępne dane sugerują, że wczesne niedobory żywieniowe mogą wpływać na płodność samic w późniejszym życiu. Gu i współpracownicy (2024) wykazali, że ograniczenie podaży białka w diecie karmiących samic prowadzi do zmniejszenia liczebności miotu u ich córek. Z kolei Gallo i współpracownicy (2012) odnotowali, że niedożywienie okołoporodowe i niska masa urodzeniowa wiązały się ze spadkiem liczebności miotu, jednak efekt ten ujawniał się dopiero przy zaawansowanym wieku rozrodczym. Odmiennie, Rogers i współpracownicy (2003) nie stwierdzili negatywnego wpływu wczesnego stresu żywieniowego na parametry rozrodcze samic F1.

Pokoleniowy wymiar obserwowanych efektów potwierdzają również wyniki dotyczące dojrzewania płciowego. U samic z grupy LL stwierdzono opóźnienie otwarcia dróg rodnych, jednak bez towarzyszących zmian w pozostałych wskaźnikach dojrzewania płciowego i funkcji rozrodczych.

Abey i współpracownicy (2021) opisali efekt diety niskobiałkowej u samic obserwowany w dwóch kolejnych pokoleniach, przy czym w tym modelu samice F2 pozostawały na tej samej diecie co matki. W obu pokoleniach niedobór białka spowodował opóźnienie dojrzewania płciowego, nieregularność cykli rujowych oraz obniżenie rozrodczości, a nasilenie efektu rosło wraz ze stopniem redukcji. Bardziej zaawansowane zaburzenia obserwowane u samic F2 w tym modelu, w porównaniu z wynikami niniejszej pracy, mogły wynikać z dłuższego czasu ekspozycji na niedobór białka – obejmującego okres przed zajściem w ciążę, ciążę, laktację oraz z ponowną ekspozycją w pokoleniu F2.

Interesującą obserwacją w grupie LL była osłabiona odpowiedź na standardową stymulację hormonalną z użyciem PMSG i hCG, przejawiająca się mniejszą liczbą uzyskanych oocytów w porównaniu z grupą CC. Efekt ten nie występował, gdy w pierwszym etapie stymulacji zamiast PMSG użyto hyperOVA, który (oprócz PMSG) zawiera surowicę z przeciwciałami

skierowanymi przeciwko inhibinie, prowadząc do zwiększenia poziomu FSH i rekrutacji większej liczby pęcherzyków do wzrostu. Może to sugerować silniejsze hamowanie wydzielania FSH przez inhibinę, zmniejszoną wrażliwość pęcherzyków na FSH lub obniżoną gotowości pęcherzyków do odpowiedzi na krótkotrwałą stymulację PMSG u samic LL. Warto zaznaczyć, że zmiany te nie miały znaczenia fizjologicznego, ponieważ samice LL nie wykazywały trudności z zajściem w ciążę, a liczebność miotów pozostawała porównywalna z grupą kontrolną. Niemniej jednak obserwacja ta może wskazywać na subtelne, utrwalone zmiany na poziomie molekularnym w obrębie osi HPG, które wymagają dalszych badań.

5.3. Wczesny stres żywieniowy opóźnia dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych i wpływa na produkcję hormonów

Ze względu na fakt, że folikulogeneza u myszy przebiega w dużej mierze postnatalnie i pozostaje wrażliwa na stan odżywienia organizmu (Tingen i in., 2009; Di Berardino i in., 2022), zakładano, że wczesny stres żywieniowy może niekorzystnie wpłynąć na ten proces. W 21 dniu życia samice LUN miały mniejszą liczbę pęcherzyków antralnych, a ich jajniki były wyraźnie mniejsze w porównaniu z grupą kontrolną. Zmniejszoną liczbę pęcherzyków antralnych/przedowulacyjnych obserwowano także u dorosłych samic. Ponadto u dojrzałych osobników stwierdzono mniejszą liczbę pęcherzyków drugorzędowych, co może wskazywać zarówno na zaburzenia dojrzewania pęcherzyków, jak i na przyspieszone wyczerpywanie się rezerwy jajnikowej.

Ograniczeniom folikulogenezy obserwowanym w PND21 towarzyszyły zmiany na poziomie molekularnym. Analiza RNA-seq wykazała obniżoną ekspresję genów zaangażowanych w dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, w tym podjednostek inhibiny (*Inhba*, *Inhbb*), przy czym wyraźny spadek ekspresji *Inhba* potwierdzono metodą RT-qPCR. Stwierdzono również zmiany ekspresji genów kodujących receptory hormonów osi HPG, w tym *Esr1* i *Lhcgr*, co sugeruje zmiany w odpowiedzi jajnika na sygnały estrogenowe i gonadotropowe.

Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami Bernal i współpracowników (2010), którzy opisali ograniczenie liczby pęcherzyków antralnych u dorosłych samic pokolenia F1 w następstwie niedożywienia matki w okresie laktacji (ograniczenie dawki karmy o 50% w stosunku do grupy kontrolnej). Zbliżony efekt zaobserwowano również w modelu ograniczenia podaży białka u karmiących samic, przy ocenie pęcherzyków jajnikowych u potomstwa w 21 dniu życia (Guzman i in., 2014). Co interesujące, w innym badaniu z restrykcją białka podczas laktacji u dorosłych córek stwierdzono zwiększoną liczbę małych pęcherzyków antralnych, przy jednoczesnym spadku liczby pęcherzyków Graafa (Faria i in., 2008), co może wskazywać na upośledzenie końcowych etapów dojrzewania pęcherzyków w tym modelu.

W niniejszej pracy obserwowany fenotyp może natomiast odzwierciedlać zarówno zredukowaną rezerwę jajnikową, związaną z mniejszymi rozmiarami jajników, jaki i zaburzenia folikulogenezy na poziomie molekularnym. Należy jednak zaznaczyć, że dotychczas opisywano również przypadki zwiększonej liczby pęcherzyków antralnych u samic narażonych na niedobory składników odżywczych we wczesnym okresie życia (Aguar i in., 2025), co podkreśla złożoność odpowiedzi jajnika na wczesny stres żywieniowy.

Zmniejszonej liczbie pęcherzyków jajnikowych u samic LUN towarzyszyły zaburzenia hormonalne. W momencie odsadzenia od matki obserwowano istotnie obniżone stężenie androstendionu w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono jednak różnic w poziomie E2, co było wynikiem nieoczekiwanym w świetle pozostałych obserwacji:

(I) zmniejszonej liczby pęcherzyków antralnych, stanowiących główne źródło E2 w komórkach ziarnistych, (II) obniżonego poziomu androstendionu jako substratu do syntezy estrogenów oraz (III) zmniejszonej ekspresji genów związanych ze steroidogenezą (*Star*, *Hsd3b1*), przy jednoczesnym wzroście ekspresji *Esr1* w jajniku. Równolegle u samic LUN stwierdzono podwyższony poziom LH w osoczu, co może wskazywać na osłabienie ujemnego sprzężenia zwrotnego estrogenów na poziomie osi podwzgórze-przysadka.

Dostępne dane nie dają jednoznacznych wskazań co do poziomu E2 jakiego należałoby się spodziewać w następstwie wczesnego stresu żywieniowego. W zależności od modelu eksperymentalnego opisano zarówno spadek, brak zmian, jak i wzrost stężenia E2. Przykładowo, ograniczenia podaży białka lub całkowitej energii matkom w okresie ciąży prowadziło do obniżenia poziomu E2 u dorosłego potomstwa (Sathishkumar i in., 2012; Khorram, 2015), podczas gdy inne badania nie wykazały wpływu 50% restrykcji żywieniowej matki, zarówno pod koniec ciąży, jak i podczas laktacji, na poziom tego hormonu (Léonhardt i in., 2003). Niektóre doniesienia wiążą natomiast restrykcję energetyczną w okresie laktacji z podwyższonym stężeniem E2 w osoczu dorosłych córek (Bittencourt Brasil i in., 2010; Aguiar i in., 2025). Warto jednak wspomnieć, że od lat oznaczenia E2 w osoczu myszy stanowią wyzwanie ze względu na specyficzność przeciwciał oraz wiązanie innych steroidów bądź związków endogennych w testach ELISA i RIA, co także może przyczyniać się do rozbieżności wyników między publikacjami. Podczas realizacji badań bez zadawalających rezultatów przetestowano kilka zestawów do oznaczeń E2 dostępnych na rynku. Ostatecznie zdecydowano o wykonaniu oznaczeń we współpracy z prof. Susanne E. Ulbrich z ETH Zurych. Niestety ze względu na ograniczoną objętość prób, nie było możliwe zastosowanie bardziej selektywnego podejścia z użyciem metod LC-MS/MS lub GC-MS/MS.

Podwyższone stężenie LH u samic LUN w 21 dniu życia, przy jednoczesnym opóźnieniu dojrzewania płciowego, wpisuje się w obraz centralnej kompensacji w odpowiedzi na zmniejszoną wydolność jajnika. Obniżona ekspresja *Lhcgr* oraz *Hsd3b1* może prowadzić do ograniczenia syntezy androstendionu, a spadek ekspresji *Inhba* dodatkowo osłabiać ujemne sprzężenie zwrotne na poziomie przysadki, nawet przy braku różnic w poziomie E2.

W kontekście wielopokoleniowego przekazywania skutków wczesnego stresu żywieniowego, w pokoleniu F2 nie stwierdzono istotnych różnic w liczbie pęcherzyków jajnikowych ani wielkości jajników w 21 dniu życia. Jediną obserwowaną zmianą na poziomie hormonalnym było podwyższone stężenie E2 w osoczu samic LL w dniu odsadzenia w porównaniu z grupą CC. Nie wykazano również istotnych zmian w ekspresji większości genów zaangażowanych w steroidogenezę, z wyjątkiem genu *Cyp17a1*, którego ekspresja była podwyższona w jajnikach samic LL.

Nową perspektywę dla interpretacji wyników dotyczących E2 uzyskanych w niniejszej pracy wnoszą badania Sui'a i współpracowników (2014) przeprowadzone na modelu świni domowej. Autorzy wykazali, że restrykcja podaży białka w ciąży i laktacji u matki, kontynuowana następnie u potomstwa, prowadziła u dorosłych samic F1 do podwyższenia poziomu E2 w osoczu, przy jednoczesnym obniżeniu liczby pęcherzyków Graafa. Mimo braku zmian w ekspresji genu *CYP19A1*, poziom białka aromatazy cytochromu P450 był istotnie wyższy w grupie z restrykcją, co autorzy wiązali obniżoną ekspresją miRNA negatywnie regulujących ekspresję *CYP19A1*. Taki mechanizm mógłby tłumaczyć zarówno brak spadku E2 w pokoleniu F1 mimo obniżonej liczby pęcherzyków antralnych, jak i podwyższone stężenie E2 obserwowane w grupie LL.

Część obserwowanych zmian w jajnikach samic LUN może wynikać z epigenetycznego przeprogramowania indukowanego wczesnym stresem żywieniowym. Na rzecz tej interpretacji przemawiają przejściowe zmiany w ekspresji genów kodujących metylotransferazy DNA w jajnikach samic LUN w 21 dniu życia. Najprawdopodobniej był to rozwojowy, czasowy wzrost aktywności aparatu metylacyjnego w jajnikach, wystarczający do ustawienia trwałych wzorów metylacji DNA bez konieczności utrzymywania podwyższonej ekspresji metylotransferazy DNA w dorosłości. Odmienny kierunek zmian obserwowany w pokoleniu F2 (obniżenie ekspresji *Dnmt3a* w grupie LL względem CC) może natomiast odzwierciedlać różnice w wymaganiach dotyczących odbudowy metylomu w trakcie gametogenezy i wczesnego rozwoju, potencjalnie w odpowiedzi na zmienione środowisko matczyne. Należy jednak podkreślić, że powyższe interpretacje mają charakter hipotez i wymagają dalszego, bezpośredniego potwierdzenia w badaniach ukierunkowanych na analizę wzorców metylacji DNA oraz ich funkcjonalnych konsekwencji.

5.4. Wczesny stres żywieniowy prowadzi do metabolicznego przeprogramowania jajników

Jednym z najistotniejszych efektów ujawnionych w analizie danych sekwencjonowania RNA jajników, pobranych od samic w 21 dniu życia, była zwiększona ekspresja genów zaangażowanych w procesy związane z lokalizacją, magazynowaniem i metabolizmem lipidów w grupie LUN. Spośród genów związanych z gospodarką lipidową wytypowano pięć genów na podstawie ich zaangażowania w procesy metaboliczne tłuszczów, wartości \log_2FC oraz istotności statystycznej wyników: *Ces1d*, *Ces1f*, *Cd36*, *Nr1h3* oraz *Cidec*. Zwiększoną ekspresję tych genów w jajnikach samic LUN w 21 dniu życia potwierdzono metodą RT-qPCR. Wśród genów o obniżonej ekspresji znalazł się natomiast gen *Star*, kodujący białko odpowiedzialne za transport cholesterolu do mitochondriów.

Lipidy w jajniku pełnią podwójną funkcję – stanowią zarówno źródło energii, jak i substrat niezbędny do syntezy hormonów steroidowych. Kwasy tłuszczowe ulegają β -oksydacji w mitochondriach komórek pęcherzyka jajnikowego, dostarczając ATP niezbędnego do procesów dojrzewania oocytu oraz steroidogenezy (Dunning i in., 2014). Cholesterol jest natomiast podstawowym prekursorem hormonów steroidowych, a jego transport do mitochondriów przez białko StAR umożliwia syntezę pregnenolonu, stanowiącego pierwszy etap steroidogenezy (Khan i wsp., 2021). Krople lipidowe pełnią dodatkowo rolę magazynów substratów oraz miejsc lokalizacji enzymów steroidogennych, wspierając efektywną syntezę progesteronu i estrogenów (Przygodzka i wsp., 2025). W konsekwencji zarówno β -oksydacja kwasów tłuszczowych, jak i metabolizm cholesterolu są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania i aktywności hormonalnej jajnika.

Wzmożona ekspresja genów *Ces1f*, *Ces1d*, *Cidec*, *Cd36* i *Nr1h3* w jajnikach córek matek niedożywionych w okresie laktacji może świadczyć o metabolicznym przeprogramowaniu jajnika w kierunku zwiększonego pobierania, magazynowania i wykorzystania lipidów. Zwiększona ekspresja genów kodujących enzymy hydrolizujące estry cholesterolu i trójglicerydy (*Ces1f*, *Ces1d*) może sprzyjać mobilizacji substratów do steroidogenezy i β -oksydacji w warunkach ograniczonej dostępności energii w okresie wczesnego rozwoju (Lian i in., 2018). Jednocześnie nadekspresja *Cidec* i *Cd36* sugeruje nasilone gromadzenie tłuszczów w kroplach lipidowych oraz zwiększony transport kwasów tłuszczowych do wnętrza komórek (Rubio-Cabezas i in., 2009; Febbraio i in., 2001). Aktywacja receptora jądrowego kodowanego przez gen *Nr1h3* może pełnić funkcję kompensacyjną, regulując homeostazę

cholesterolu i wspierając steroidogenezę (Uemura i in., 2011), mimo granicznej ekspresji *Star*. Tego typu zmiany mogą stanowić adaptację do wczesnego niedoboru energetycznego, umożliwiając krótkoterminowe utrzymanie równowagi metabolicznej i potencjału rozrodczego.

Dotychczasowe doniesienia dotyczące metabolicznego przeprogramowania jajnika w kierunku zmian w magazynowaniu, wykorzystaniu i metabolizmie lipidów pochodzą niemal wyłącznie z modeli otyłości i nadmiaru energii (Wu i in., 2010; Li i in., 2021; Gao i in., 2023). Istotnym czynnikiem pozostaje również skład samej diety. Zhou i współpracownicy (2022), wykazali, że dieta bogata w kwas oleinowy prowadzi do przebudowy profilu lipidów gromadzonych w kroplach lipidowych komórek ziarnistych i obniżenia wydajności steroidogenezы. Również sama dieta wysokotłuszczowa, nawet bez wywołania otyłości, sprzyja zwiększonemu odkładaniu lipidów w jajniku (Hohos i in., 2019).

W celu identyfikacji molekularnych markerów potencjalnie przekazywanych pomiędzy pokoleniami w następstwie niedożywienia matki w czasie laktacji, przeprowadzono analizę różnic w ekspresji genów pomiędzy grupami LL i LC a grupą CC. Poszukiwano przy tym genów wspólnych z wytypowanymi w porównaniu LUN vs. CON. Liczba takich genów była wyraźnie większa w grupie LL niż w LC, co może sugerować silniejszy efekt programowania żywieniowego, gdy oboje rodziców posiadało historię stresu żywieniowego w okresie postnatalnym. Wśród genów o utrzymującej się zmienionej ekspresji w pokoleniu F2 znalazły się między innymi *Ces1d* oraz *Ces1f*, których nadekspresja, jak opisano wcześniej, może wiązać się ze zwiększoną mobilizacją lipidów w jajnikach. Choć analiza GO w pokoleniu F2 nie wykazała tak wyraźnej nadreprezentacji procesów związanych z metabolizmem lipidów jak w F1, obecność trwałych zmian w ekspresji *Ces1d* i *Ces1f* może stanowić molekularny ślad wczesnego programowania żywieniowego.

5.5. Matczyne niedożywienie w okresie laktacji zmienia profil bioenergetyczny oocytów potomstwa

Potencjał rozwojowy oocytów jest jednym z kluczowych czynników determinujących sukces rozrodczy. Choć nie wszystkie mechanizmy leżące u podstaw kompetencji rozwojowej komórki jajowej zostały dotychczas poznane, wiadomo, że jest ona ściśle związana metabolizmem i stanem bioenergetycznym oocytu (Sirard, 2011). Wyniki RNA-seq opisane w poprzednim podrozdziale dostarczyły przesłanek do pogłębionej oceny parametrów związanych z wytwarzaniem i przetwarzaniem energii w oocycie. W pokoleniu F1 odnotowano istotne zmiany w profilu bioenergetycznym oocytów samic LUN. Obserwowano zwiększoną akumulację lipidów – zarówno w postaci większej liczby kropli lipidowych, jak i podwyższonej fluorescencji barwnika BODIPY – a także podwyższony potencjał błony mitochondrialnej oraz wyższy wskaźnik redoks (ORR) w warunkach podstawowych, bez dodatkowej stymulacji. Gdy zastosowano różne stężenia pirogronianu, oocyty LUN nie wykazywały wzrostu ORR przy jego niskim stężeniu, dopiero przy najwyższej dawce odpowiedź w zakresie ORR była większa niż w grupie kontrolnej.

Akumulacja lipidów w oocytach może pełnić rolę rezerwy substratowej, jednak ich nadmiar bywa związany z ryzykiem lipotoksyczności (Wu i in., 2010). W prezentowanych wynikach brak różnic w poziomie ROS pomiędzy grupami nie potwierdza jednak scenariusza lipotoksyczności. Zamiast tego wyniki sugerują, że w oocytach samic LUN doszło do przeprogramowania metabolicznego, w którym komórki preferencyjnie wykorzystują

trójglicerydy zmagazynowane w kroplach lipidowych w procesie β -oksydacji. Interpretację tę wspierają zarówno wyniki RNA-seq całych jajników, jak i obserwowany wzrost MMP w oocytach oraz podwyższenie ORR dopiero przy wyższych stężeniach pirogronianu, co wskazuje na zmniejszoną zależność energetyczną od tego substratu. Dodatkowym argumentem przemawiającym za tą interpretacją jest obecność większej liczby mniejszych kropli lipidowych w oocytach samic LUN, które mogą być łatwiej mobilizowane do β -oksydacji. Choć nie odnotowano wzrostu całkowitego poziomu ATP w komórkach, co mogłoby być oczekiwanym następstwem nasilonego utleniania kwasów tłuszczowych, uzyskane wyniki mogą świadczyć o adaptacyjnej roli tego procesu, ukierunkowanej na utrzymanie równowagi redoks oraz ograniczenie stresu oksydacyjnego.

Opisane wyniki są spójne z doniesieniami wskazującymi, że zarówno skład diety, jak i sposób odżywiania rodziców wpływają na metabolizm i bioenergetykę komórek jajowych. W modelu otyłości jednoznacznie wykazano negatywne skutki diety wysokotłuszczowej, obejmujące zmiany ultrastruktury mitochondriów, ich dysfunkcje oraz wzrost poziomu ROS (Saben i in., 2016; Xhonneux i in., 2023). W modelach niedożywienia wykazano natomiast, że nawet krótkotrwały niedobór białka na etapie dojrzewania oocytu wystarcza, by wpłynąć na rozwój potomstwa, co potwierdza wyjątkową wrażliwość komórki jajowej na sygnały żywieniowe (Watkins i in., 2008). W kolejnych badaniach wskazano, że restrykcja białka obejmująca okres dojrzewania pęcherzyków od stadium pierwotnego do przedowulacyjnego prowadzi do zmian w ultrastrukturze mitochondriów w COCs oraz do modyfikacji ekspresji genów związanych z biogenezą mitochondriów (Schutt i in., 2019). Wu i współpracownicy (2010) wykazali, że dieta wysokotłuszczowa sprzyja akumulacji kropli lipidowych w obrębie COCs, przy jednoczesnym obniżeniu MMP oraz wzroście apoptozy w komórkach granulocy i komórkach wieńca promienistego.

Szczególnie istotne dla modelu zastosowanego w niniejszej pracy jest okno programowania podczas laktacji. Najnowsze badania u myszy wykazały, że niska podaż białka ograniczona wyłącznie do okresu laktacji u matek F0 prowadzi do zmniejszenia owulacji i liczebności miotów w pokoleniu F1, a w oocytach F1 obserwuje się zmiany metylomu i transkryptomu, które częściowo utrzymują się w pokoleniu F2 (Gu i in., 2024). Wielopokoleniowe efekty opisane w niniejszej pracy wpisują się w koncepcję epigenetycznego „ustawienia” punktu pracy oocytu, rozumianego jako ukształtowanie podstawowych parametrów regulacyjnych komórki jajowej podczas jej dojrzewania pod wpływem warunków metaboliczno-hormonalnych. Dodatkowego wsparcia dla tej hipotezy dostarczają badania niedożywienia *in utero*, w których zaburzenia metaboliczne obserwowane w pokoleniu F1 były przekazywane do F2 poprzez zmiany metylacji w oocytach F1, wzmacniając założenie, że oocyty mogą pełnić funkcję nośnika pamięci żywieniowej (Tang i in., 2023).

W niniejszej pracy największe zmiany w zakresie bioenergetyki oocytu w pokoleniu F2 zaobserwowano u potomstwa obojga niedożywionych rodziców (grupa LL). Oprócz zwiększonej akumulacji lipidów stwierdzono u nich wyższy MMP, niższy poziom ROS oraz obniżoną autofluorescencję NADPH i FAD przy jednocześnie wyższym wskaźniku ORR w porównaniu do grupy CC. Taki profil metaboliczny sugeruje intensywne wykorzystanie lipidów jako substratów energetycznych oraz aktywne funkcjonowanie systemów antyoksydacyjnych. Z jednej strony może on stanowić adaptacyjny stan przygotowujący oocyt do wysokich wymagań energetycznych związanych z zapłodnieniem i wczesnym rozwojem zarodka, z drugiej – potencjalnie odzwierciedlać zwiększone obciążenie metaboliczne,

które w dłuższej perspektywie mogłoby pogarszać jakość oocytu. W świetle wyników dotyczących zachowanej płodności samic LL bardziej prawdopodobna wydaje się jednak interpretacja adaptacyjna.

Porównanie grup LC i LL wskazuje ponadto, że w pierwszym przypadku obserwowane zmiany są nakierowane głównie na zwiększenie rezerw energetycznych w oocycie (wyższa fluorescencja BODIPY w grupie LC), natomiast w drugim obejmują głębsze, bardziej złożone przeprogramowanie metaboliczne. Niemniej jednak pełne potwierdzenie zaproponowanych mechanizmów – w szczególności bezpośredniego udziału β -oksydacji oraz epigenetycznych zmian regulujących metabolizm oocytu – wymaga dalszych, ukierunkowanych badań funkcjonalnych.

5.6. Wczesny stres żywieniowy zmienia przestrzenny rozkład ekspresji transkryptów i białek w podwzgórzu

Zgodnie z doniesieniami Kaczmarek i współpracowników (2016) postnatalny stres żywieniowy u samic LUN prowadzi w podwzgórzu do spadku ekspresji genu *Kiss1*, co wskazuje na zaburzenie funkcji układu kisspeptynowego, będącego centralnym elementem regulacji neuroendokrynej funkcji rozrodczych. Wynik ten pozostaje spójny z danymi dotyczącymi programowania osi rozrodczej w następstwie niedożywienia matki (Iwasa i in., 2010; Castellano in., 2011). W niniejszej pracy, postanowiono przyjrzeć się dokładniej neuronom kisspeptynowym wykorzystując hybrydyzację *in situ*, jednak nie stwierdzono różnic w liczbie komórek ekspresyjujących transkrypt *Kiss1* w obrębie analizowanych obszarów podwzgórza – AVPV/PeN oraz ARC, co potwierdzono również na poziomie białka u zwierząt transgenicznym (tdTomato+). Wykazano natomiast istotne obniżenie zagęszczenia sygnału transkryptu *Kiss1* w obrębie AVPV/PeN, co jest odzwierciedleniem niższego poziom ekspresji mRNA w pojedynczych neuronach i pozostaje w zgodzie z wynikami Aguiar i współpracowników (2025). Obniżona ekspresja *Kiss1* na poziomie pojedynczych neuronów w AVPV/PeN jest spójna z fenotypem opóźnionego dojrzewania płciowego samic LUN i może wskazywać na osłabioną aktywację osi HPG w okresie okołopokwitaniowym. Z założeniem tym nie w pełni koresponduje jednak brak istotnych różnic między grupami w liczbie komórek tdTomato+ w AVPV/PeN. Choć w grupie LUN obserwowano bardziej jednorodny rozkład liczby tych komórek pomiędzy osobnikami, z tendencją do niższych wartości względem grupy kontrolnej, duża zmienność w grupie CON, utrudniła jednoznaczną interpretację tych wyników.

Ze względu na znaną regulację ekspresji kisspeptyny przez E2, zarówno przed osiągnięciem dojrzałości płciowej, jak i u samic cyklicznych (Smith i in., 2005; Clarson i in., 2009), uzasadnione było przeanalizowanie w podwzgórzu ekspresji receptora estrogenowego – ER α (*Esr1*). Dodatkowym argumentem przemawiającym za wykonaniem tych analiz był fakt, że ER α uznawany jest za istotny mediator efektów programowania żywieniowego (Roepke i in., 2017). Analiza hybrydyzacji *in situ* nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami w liczbie komórek *Esr1*+ i liczbie transkryptów *Esr1* przypadających na komórkę w 21 dniu życia. Natomiast, analizy immunofluorescencyjne ujawniły zwiększoną liczbę komórek z ekspresją ER α u samic LUN w obrębie AVPV/PeN, co wpisuje się w mechanizm kompensacyjny ukierunkowany na wzmocnienie sygnalizacji estrogenowej oraz aktywację osi HPG.

Należy podkreślić, że obecność transkryptu nie zawsze przekłada się bezpośrednio na poziom funkcjonalnego białka, a nawet niewielka liczba kopii mRNA może wystarczyć do utrzymania

wykrywalnej ilości ER α w jądrze. Obserwowane rozbieżności najprawdopodobniej wynikają z różnic w czułości i charakterze zastosowanych metod – RNAscope, umożliwiającej detekcję i lokalizację transkryptu oraz immunofluorescencji, obrazującej poziom i intensywność sygnału docelowego białka rozpoznawanego przez swoiste przeciwciała. Wyniki te nie muszą być sprzeczne, lecz wskazują, że zmiany w przekaźnictwie estrogenowym u samic LUN mogą przebiegać subtelnie i na różnych poziomach regulacji – od transkrypcji, przez translację, po stabilność białka.

Dodatkowe analizy hybrydyzacji *in situ* objęły ocenę współekspresji *Kiss1*, *Tac2* i *Pdyn* (markerów neuronów KNDy) oraz ekspresji *Lepr* w ARC. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami w liczbie neuronów KNDy. Zauważono jednak, że sygnały *Kiss1* i *Tac2* niemal w całości kolokalizowały w tych samych komórkach, podczas gdy tylko około połowa komórek *Kiss1*⁺ wykazywała ekspresję *Pdyn* w obu badanych grupach. Taki wzorec ekspresji w 21 dniu życia może odzwierciedlać rozwojowe dojrzewanie układu kisspeptynowego, gdyż u dorosłych samic prawie wszystkie komórki *Kiss1*⁺ w ARC wykazują już ekspresję genu kodującego prodynorfinę (Navarro i in., 2009).

Analiza ekspresji transkryptu *Lepr* wykazała zarówno wzrost liczby komórek *Lepr*⁺, jak i zwiększone zagęszczenie sygnału w ARC samic LUN. Zwiększona ekspresja receptorów leptyny w tym obszarze może świadczyć o kompensacyjnym wzroście wrażliwości neuronów podwzgórza po osłabieniu sygnału leptynowego w okresie laktacji, co potwierdzają wcześniejsze badania wskazujące, że zaburzenia w wystąpieniu poporodowego wzrostu poziomu leptyny trwale zmieniają rozwój i wrażliwość neuronów podwzgórza (Bouret i wsp., 2010; Cottrell i wsp., 2011). W koncepcji „metabolicznego bramkowania” osi HPG wzrost ekspresji *Lepr* może obniżać próg energetyczny potrzebny do inicjacji aktywności osi HPG, ale jednocześnie sprzyjać mniej stabilnemu wejściu w pokwitanie i nieregularności pierwszych cykli rujowych obserwowanych u samic LUN.

Poza neuronami *Kiss1*⁺ istotną rolę w regulacji osi HPG odgrywają również inne populacje podwzgórzowe, w tym neurony POMC w ARC, będące bezpośrednim celem działania leptyny i insuliny (Cheung i in., 1997; Benoit i in., 2002). Wykazano, że integracja sygnałów metabolicznych przez neurony POMC jest niezbędna dla utrzymania prawidłowej płodności – u myszy pozbawionych receptorów leptyny i insuliny w neuronach POMC obserwuje się wydłużone cykle rujowe, zatrzymanie wzrostu pęcherzyków jajnikowych, hiperandrogenemię oraz bezpłodność (Hill i in., 2010). Co istotne, neurony kisspeptynowe komunikują się z neuronami POMC (Backholer i in., 2010; Fu i van den Pol, 2010), a Kaczmarek i współpracownicy (2016) wykazali, że ekspresja genu *Pomc* ulega obniżeniu w podwzgórzu samic LUN w 21 dniu życia. Wyniki te dodatkowo wskazują na możliwy kompensacyjny charakter zwiększonej ekspresji *Lepr* w ARC.

Profil transkrypcyjny podwzgórza samic LUN, opisany przez Kaczmarek i współpracowników (2016) wskazał również wzrost ekspresji następujących genów – *Slc17a7*, *Cck*, *Calca*, *Gabrd* oraz *Prkcd*, sugerując zwiększoną aktywność neuronów glutaminergicznych i peptyderygicznych przy równoczesnym nasileniu przewodnictwa GABA-ergicznego. Taka zmiana równowagi pobudzeniowo-hamującej może odzwierciedlać funkcjonalną przebudowę sieci podwzgórzowych w odpowiedzi na wczesny stres metaboliczny. Aby jednak w pełni zrozumieć znaczenie tych zmian, konieczne są dalsze badania funkcjonalne, ponieważ w neuronach GnRH sygnalizacja przez receptor GABA-A ma charakter depolaryzujący i sprzyja aktywacji tych komórek (Moenter i DeFazio, 2005).

Podsumowując przedstawione powyżej wyniki wydaje się, że wczesny stres żywieniowy nie prowadzi do prostego zahamowania osi HPG, lecz do jej funkcjonalnego „przestrojenia”, obejmującego zmiany w integracji sygnałów metabolicznych i rozrodczych na poziomie podwzgórza.

5.7. Wczesny stres żywieniowy zaburza leptynozależną stymulację rozwoju projekcji neuronów ARC

Wzrost poziomu leptyny w osoczu w krytycznym okresie postnatalnym jest nie tylko sygnałem metabolicznym modyfikującym ekspresję genów oraz białek, lecz pełni także funkcję neurotroficzną, kształtując rozwój połączeń neuronalnych wychodzących z ARC. Pionierskie prace Sébastiena G. Boureta (Bouret i in., 2004a; 2004b) wykazały, że projekcje z ARC do kluczowych ośrodków podwzgórza powstają u myszy po urodzeniu, w ściśle określonych oknach rozwojowych, przy czym część z nich ujawnia się dopiero w 12 dniu życia (Bouret i in., 2004a). Brak leptyny u myszy *ob/ob* prowadzi do trwałego zubożenia tych projekcji, natomiast podanie leptyny w okresie postnatalnym, gdy w fizjologicznych warunkach obserwujemy jej wysoki poziom, przywraca prawidłową architekturę połączeń. Natomiast, stymulacja leptyną myszy *ob/ob* w wieku dorosłym nie odwraca powstałego defektu na poziomie podwzgórza. Dane *in vitro* potwierdzają ponadto, że leptyna bezpośrednio stymuluje wzrost aksonów neuronów ARC (Bouret i in., 2004b).

Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia, w niniejszej pracy przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem fragmentów ARC pobranych od samic w 8 dniu życia – w okresie intensywnego wzrostu i remodelowania projekcji wychodzących z ARC. Wykazano, że w grupie LUN leptynozależny wzrost aksonalny całej populacji neuronów ARC był istotnie osłabiony w porównaniu z grupą kontrolną.

W przypadku samic LUN neurony kisseptynowe cechowały się wolniejszym tempem wzrostu w porównaniu z innymi populacjami neuronalnymi ARC, przy czym leptyna zachowywała wobec nich działanie stymulujące. Interpretację tych wyników utrudniła jednak zaskakująca obserwacja niewielkiego wzrostu liczby neuronów kisseptynowych u samic z grupy CON, co uniemożliwiło przeprowadzenie analiz w tej grupie.

Można przypuszczać, że u samic LUN neurony kisseptynowe pozostają opóźnione rozwojowo, co skutkuje ich wyższą bazową zdolnością do wzrostu w analizowanym przedziale czasowym. Natomiast u samic kontrolnych najbardziej intensywny okres rozwoju projekcji neuronów kisseptynowych w rejonie ARC mógł już ulec wygaszeniu. Warto podkreślić, że była to pierwsza ocena wzrostu neuronów kisseptynowych w okresie postnatalnym u myszy. Brak systematycznych badań opisujących dynamikę wzrostu neuronów kisseptynowych w ARC w okresie wczesnego rozwoju podkreśla nowatorski charakter wyników uzyskanych w niniejszej pracy.

Zaobserwowany u samic LUN spadek wrażliwości ogólnej populacji neuronów ARC na stymulację leptyną wpisuje się w szersze doniesienia wskazujące, że postnatalne warunki żywieniowe trwale kształtują plastyczność obwodów podwzgórza. Decourtye-Espiard i współpracownicy (2023) potwierdzili bezpośrednią, neurotroficzną rolę leptyny w regulacji wzrostu aksonów neuronów ARC. W modelu niedożywienia opartym na zwiększeniu liczebności miotu, neurony ARC młodych wykazywały obniżoną wrażliwość na leptynę przy analizie całej populacji (barwienie neurofilamentów). Po rozdzieleniu typów neuronalnych ujawniono jednak efekt selektywny – spadek wrażliwości neuronów GHRH (ang. *growth*

hormone-releasing hormone) przy braku istotnych zmian w populacji neuronów AgRP (ang. *agouti-related peptide*). Inne wyniki uzyskano w modelu szczurów podatnych na otyłość, gdzie we wczesnym okresie życia (PND6) stymulacja leptyną nie indukowała wzrostu aksonów neuronów ARC (Bouret i in., 2008). Natomiast w badaniach Bouret'a i współpracowników (2008) wykazano, że oporność na leptynę już w okresie noworodkowym wiąże się z nieprawidłowym ukształtowaniem projekcji ARC (populacje AgRP i α -MSH), co pozostaje widoczne również u dorosłych szczurów. Z perspektywy funkcji rozrodczych szczególnie istotne jest, że w modelu zwiększonej liczebności miotu u dorosłych samic myszy stwierdzono zmniejszoną gęstość projekcji kisspeptynowych biegnących do obszaru przedwzrokowego podwzgórza (Caron i in., 2012).

Łącznie doniesienia innych badaczy oraz wyniki uzyskane w niniejszej pracy wspierają model, w którym postnatalny rozwój projekcji neuronów ARC jest sterowany przez leptynę i podatny na programowanie żywieniowe, co może mieć długofalowe konsekwencje zarówno dla regulacji bilansu energetycznego, jak i dla inicjacji oraz stabilność funkcji rozrodczych w dorosłości – nawet przy braku bezpośrednich zmian liczby neuronów kisspeptynowych w ARC.

5.8. Potencjalne mechanizmy programowania osi HPG przez wczesny stres żywieniowy

Dane dostępne w literaturze naukowej, a także wyniki niniejszej pracy wskazują, że leptyna może być jednym z kluczowych mediatorów programowania osi HPG. Fizjologiczny wzrost obwodowego stężenia leptyny w okresie postnatalnym pełni rolę neurotroficzną i warunkuje prawidłowe kształtowanie projekcji podwzgórzowych, w tym tych wychodzących z ARC (Bouret i in. 2004a; 2004b). Jako sygnał zasobów energetycznych organizmu leptyna informuje ośrodki podwzgórzowe o stanie odżywienia, a odpowiednia wrażliwość neuronów na ten hormon jest niezbędna do zachowania prawidłowych funkcji rozrodczych (Chehab i in., 1996; Ahima i in., 1997).

Rolę leptyny w programowaniu żywieniowym podkreśla dodatkowo zwiększona ekspresja genu kodującego receptor leptyny (*Lepr*) w ARC samic LUN, co może być przykładem kompensacyjnego uwrażliwienia neuronów na ten hormon po wczesnej hipoleptynii. Co więcej, niedobór lub zakłócenie sygnalizacji leptyny we wczesnym okresie życia może sprzyjać zwiększonej akumulacji trójglicerydów w tkankach, ponieważ hormon ten hamuje lipogenezę i przesuwa metabolizm w kierunku utleniania kwasów tłuszczowych (Martínez-Uña i in., 2020). Dotychczasowe dowody na istnienie takiego mechanizmu dotyczą głównie wątroby i mięśni, natomiast rola leptyny w regulacji metabolizmu lipidów w jajniku pozostaje słabiej scharakteryzowana. Można jedynie przypuszczać, że zakłócenie sygnalizacji leptynowej w krytycznym oknie rozwoju predysponuje samice LUN do trwałego przeprogramowania metabolizmu lipidów w tej tkance.

Aby rozstrzygnąć, czy to niedobór leptyny stanowi czynnik sprawczy obserwowanych efektów niedożywienia, zasadne byłoby przeprowadzenie doświadczenia z suplementacją samic LUN leptyną w krytycznym oknie rozwojowym, zbiegającym się z fizjologicznie wysokim stężeniem tego hormonu w osoczu samic kontrolnych. Taki eksperyment, zakończony oceną funkcji rozrodczych, organizacji szlaków podwzgórzowych, profilu lipidowego jajnika oraz steroidogenezy, pozwoliłby zweryfikować, czy przywrócenie sygnału leptynowego

we właściwym momencie zapobiega utrwaleniu niekorzystnych skutków programowania żywieniowego.

Przy interpretacji uzyskanych wyników należy uwzględnić fakt, że część efektów obserwowanych u samic LUN może wynikać z ogólnego zahamowania wzrostu organizmu, w tym z mniejszych rozmiarów jajników. To tłumaczyłoby spadek potencjału rozrodczego obserwowany w późniejszym wieku reprodukcyjnym (około 6 miesiąca życia). Brak danych dotyczących liczby pęcherzyków pierwotnych ogranicza siłę wnioskowania, niemniej jednak najbardziej prawdopodobne wyjaśnienia obejmują zawężoną rezerwę jajnikową i/lub zaburzenia rekrutacji oraz dojrzewania pęcherzyków jajnikowych.

Najsilniejsze efekty programowania żywieniowego, najlepiej odpowiadające definicji tego zjawiska, zaobserwowano na poziomie komórek jajowych. Przeprogramowanie metabolizmu oocytów obejmowało zmiany w gospodarce lipidowej oraz bioenergetyce mitochondriów, które były widoczne w pokoleniu F1 i częściowo utrzymywały się w pokoleniu F2. Największą skalę zmian odnotowano w grupie LL, w której nakładał się wpływ historii stresu żywieniowego obojga rodziców. Dotychczasowe doniesienia potwierdzają, że sposób żywienia matki w ciąży lub podczas laktacji może modulować metabolizm potomstwa aż do pokolenia F2 (Gu i in., 2024; Tang i in., 2023). Jednak obserwowane efekty mogą być konsekwencją zarówno zmian epigenetycznych, modyfikacji środowiska macicy, jak i zmian w składzie mleka matczyne (González-Recio i in. 2012; Aiken i in., 2016; Chu i in., 2016).

Równolegle w dotychczasowych doniesieniach wykazano, że dieta ojca wpływa na stan metaboliczny potomstwa zarówno w oparciu o mechanizmy epigenetyczne, jak i modyfikacje składu plazmy nasienia (Watkins i in., 2018). Wyniki Tomar i współpracowników (2024) dodatkowo podkreślają znaczenie stanu zdrowia ojca w chwili poczęcia i wskazują na rolę mitochondrialnych tRNA przenoszonych przez plemniki w przekazywaniu niekorzystnych efektów na kolejne pokolenia.

Obserwacje poczynione w niniejszej dysertacji wpisują się w koncepcję addytywności efektów rodzicielskich, wcześniej opisaną zarówno w interwencjach prozdrowotnych, jak i w modelach otyłości (McPherson in., 2015; Zheng i in., 2020; Ramadan i in., 2023). Najistotniejsze odchylenia w parametrach dojrzewania, masy ciała oraz ekspresji genów w jajnikach odnotowano właśnie w grupie LL, co dodatkowo przemawia za sumowaniem się sygnałów pochodzących od obojga rodziców. Wyniki te wskazują, że skuteczna prewencja niekorzystnych fenotypów u potomstwa powinna obejmować zmianę sposobu odżywiania obojga rodziców, a nie wyłącznie matki, oraz uwzględnić znaczenie żywienia już na najwcześniejszych etapach życia.

Aby jednoznacznie oddzielić wpływ środowiska matczyne od czynników dziedzicznych (epigenetycznych), należałoby zaplanować dwa uzupełniające eksperymenty: (I) transfer zarodków – w celu ograniczenia oddziaływań ze strony łożyska podczas ciąży oraz (II) krzyżowe wychowanie (ang. *cross-fostering*) – w celu kontroli wpływu składu mleka i opieki matki we wczesnym okresie postnatalnym. Dla wyodrębnienia wkładu ojcowskiego zasadne byłoby także wprowadzenie grupy CL, w której matka pochodziłaby z grupy kontrolnej, a ojciec z grupy LUN. Dodatkowo eksperyment z zapłodnieniem *in vitro*, połączony z transferem zarodków do samic krytych wazektomizowanymi samcami z przeciwnej grupy pozwoliłby oddzielić epigenetyczne efekty pochodzące z plemnika od wpływu składników plazmy nasienia.

Podsumowując, obserwowane efekty w pokoleniach F1 i F2 wskazują, że niedożywienie we wczesnym okresie życia prowadzi do wielopoziomowego przeprogramowania potomstwa, obejmującego zmiany we wzrastaniu i dojrzewaniu, modulację funkcji osi HPG oraz głębokie modyfikacje metaboliczne oocytu. Część efektów obserwowanych w pokoleniu F2 może mieć podłoże epigenetyczne, na co wskazuje nasilenie zmian w grupie LL, jak i odnotowane w tej grupie różnice w ekspresji genu *Dnmt3a* kodującego jedną z metylotransferaz. Obserwacje te są szczególnie ważne, ponieważ utrwalone zmiany w oocytach samic F2 mogą potencjalnie modulować metabolizm i funkcje rozrodcze kolejnych pokoleń. Taki model programowania żywieniowego potwierdza istnienie krytycznych okien rozwojowych, w których odpowiednie odżywianie rodziców oraz środowisko sprzyjają kształtowaniu zdrowia potomstwa na całe życie.

5.9. Ograniczenia metodologiczne pracy i dalsze kierunki badań

Jednym z ograniczeń niniejszej rozprawy jest skala pomiaru zastosowana w niektórych doświadczeniach. Analiza ekspresji genów na poziomie całych struktur (np. całego jajnika) może maskować efekty subtelne, swoiste dla danych populacji komórek. W przyszłych badaniach zasadne będzie zatem mapowanie wytypowanych markerów w precyzyjnie zdefiniowanych populacjach komórek, takich jak komórki ziarniste i komórki osłonki. Warto również rozszerzyć analizy parametrów rozrodczych na późniejszy okres życia (po 6 miesiącu życia), ponieważ samice LUN w wieku 2-3 miesięcy nie odstawały znacząco potencjałem rozrodczym od kontroli. Może to wskazywać na istnienie mechanizmów kompensacyjnych, które umożliwiają czasowe utrzymanie prawidłowych funkcji rozrodczych.

Wyniki uzyskane dla komórek jajowych wskazują na określony kierunek programowania metabolicznego wywołanego wczesnym stresem żywieniowym, jednak nie pozwalają na rekonstrukcję jednoznacznej „mapy metabolicznej” oocytu. Brakuje między innymi kluczowych dla β -oksydacji oraz gospodarki acylo-CoA pomiarów, takich jak na przykład ocena ekspresji genów *Cpt1a*, *Cpt1b*, *Cpt2*, *Hadha*, czy *Hdhb*. Uzupełnieniem tych analiz powinno być również przeprowadzenie testów zależności metabolicznej od określonych substratów (np. z wykorzystaniem analizatora Seahorse). A dodatkowe rozszerzenie badań o profil lipidowy oocytu pozwoliłoby jeszcze lepiej powiązać metabolizm lipidów z kompetencją rozrodczą samic.

Podejście zastosowane w niniejszej pracy dostarczyło głównie pośrednich wskazówek o możliwych regulacjach epigenetycznych. Obserwowano zmiany ekspresji genów metylotransferaz DNA, ale nie analizowano map metylacji DNA (5mC/5hmC) ani modyfikacji histonów w konkretnych populacjach komórek. Tego rodzaju dane byłyby kluczowe dla jednoznacznego powiązania wczesnego stresu żywieniowego z trwałą, epigenetyczną modulacją szlaków metabolicznych i rozrodczych.

Jednym z ograniczeń niniejszej pracy pozostaje sporadycznie występująca niska liczebność grup w niektórych doświadczeniach, co mogło obniżać moc statystyczną analiz i zwiększać ryzyko uzyskania wyników granicznych. Wynikało to z wdrożenia zasady 3R, a także z czasochłonności oraz złożoności niektórych zastosowanych metod. W celu ograniczenia ryzyka błędnej interpretacji wyników przy małych próbach każdorazowo weryfikowano spełnienie założeń testów parametrycznych, a w przypadku mniejszych liczebności wyniki dodatkowo potwierdzano analizą nieparametryczną (zgodnie z opisem w sekcji 3.10). Przy bardzo małych liczebnościach stosowano wyłącznie metody

nieparametryczne. Pomimo ograniczonej liczby osobników w części doświadczeń, konsekwentnie dbano o to, aby pochodziły one z różnych miotów, co pozwalało uchwycić możliwie szeroką zmienność biologiczną i ograniczyć wpływ efektu miotu.

Mimo wymienionych ograniczeń, wyniki niniejszej pracy tworzą solidną podstawę do wyznaczenia nowych, obiecujących kierunków badań. W szczególności uzasadnione wydaje się pogłębienie analizy środowiska matczynego, obejmujące ocenę profilu ekspresji genów/białek w macicy oraz analizę funkcji łożyska. Doniesienia o zmianach na poziomie łożyska obserwowanych u córek matek niedożywionych w okresie laktacji (np. Musha i in., 2011) dodatkowo wzmacniają zasadność tego podejścia. Istotnym kierunkiem przyszłych badań pozostaje również dokładniejsze rozdzielenie wkładu matczynego i ojcowskiego w obserwowane efekty programowania żywieniowego. Wreszcie rozszerzenie obserwacji na kolejne pokolenia (F3 i dalsze) pozwoliłoby określić zasięg oraz trwałość skutków niedożywienia w okresie laktacji, a tym samym precyzyjniej zdefiniować mechanizmy leżące u podstaw długofalowych skutków programowania żywieniowego na wczesnych etapach rozwoju postnatalnego.

6. Podsumowanie i wnioski

Przedłożona rozprawa dowodzi, że niedożywienie matki w czasie laktacji – okresie o szczególnie wysokiej plastyczności rozwojowej – inicjuje przeprogramowanie osi HPG potomstwa płci żeńskiej u myszy. Zidentyfikowane zmiany mają charakter wielopoziomowy i obejmują przede wszystkim podwzgórze oraz gonady, a także układ endokrynnny. Część efektów została utrwalona na przestrzeni pokoleń, szczególnie gdy oboje rodziców było narażonych na stres żywieniowy na wczesnym etapie życia. Praca ta stanowi pierwszą tak kompleksową demonstrację rozległych skutków niedoborów żywieniowych matek w okresie laktacji w krytycznym postnatalnym oknie programowania rozwojowego potomstwa oraz wskazuje nowe kierunki badań zmierzające do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów programowania żywieniowego w perspektywie wielopokoleniowej.

W szczególności w niniejszej rozprawie wykazano, że:

1. Samice będące potomstwem matek niedożywionych w czasie laktacji (LUN) w 21 dniu życia charakteryzowały się niższą masą ciała – zarówno tłuszczową, jak i beztłuszczową – w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Obniżona masa ciała utrzymywała się także w dorosłości.
2. Samice LUN osiągały dojrzałość płciową zdecydowanie później niż samice kontrolne, a wraz z wiekiem wykazywały postępujący spadek wydajności rozrodczej.
3. Zaburzeniom funkcji rozrodczych u samic LUN towarzyszyły zmiany hormonalne: obniżony poziom leptyny i androstendionu oraz podwyższony poziom LH w 21 dniu życia (PND21), a także obniżony poziom progesteronu u osobników dojrzałych płciowo. Równolegle obserwowano zaburzenia folikulogenezy – mniejszą liczbę pęcherzyków antralnych w PND21 oraz redukcję liczby pęcherzyków drugorzędowych i antralnych u dojrzałych płciowo samic względem grupy kontrolnej.
4. W 21 dniu życia u samic LUN wykryto znaczące przestrojenie profilu transkryptomicznego jajnika, obejmujące szlaki metabolizmu lipidów i steroidogenezy, a także geny kodujące metylotransferazy DNA.
5. W oocytach pobranych od samic LUN odnotowano cechy zmienionej aktywności metabolicznej względem zwierząt kontrolnych – większą liczbę kropli lipidowych, nasilony potencjał błony mitochondrialnej, podwyższenie wskaźnika redoks (ORR) w warunkach bazowych i jego wzrost dopiero w odpowiedzi na podanie wyższych stężeń pirogronianu.
6. Na poziomie podwzgórza w 21 dniu życia w grupie LUN stwierdzono obniżoną ekspresję *Kiss1* w AVPV/PeN oraz podwyższoną ekspresję genu *Lepr* w ARC; równocześnie na poziomie białka obserwowano zwiększoną ekspresję receptora ERA w AVPV/PeN względem grupy kontrolnej.
7. Neurony ARC pobrane od samic LUN w oknie postnatalnym o największej wrażliwości na leptynę (PND8) nie wykazywały typowej dla grupy CON odpowiedzi wzrostowej, przy czym nie dotyczyło to populacji neuronów kisspeptynowych.
8. W pokoleniu F2, a w szczególności u potomstwa obojga niedożywionych rodziców (LL), utrzymywała się część zmian fenotypowych zidentyfikowanych w pokoleniu F1: w 21 dniu życia odnotowano niższą masę ciała i tkanki tłuszczowej, a w późniejszym

okresie także opóźnione otwarcie dróg rodnych. Zaobserwowano także wyższe stężenie estradiolu w osoczu w porównaniu z grupą CC.

9. W analizie transkryptomu jajnika samic pokolenia F2 (LL vs. CC) wykazano spójny profil ekspresji z pokoleniem F1 (LUN vs. CON), obejmujący podwyższenie ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów – *Ces1d* i *Ces1f*.
10. Część zmian na poziomie komórek jajowych, charakterystycznych dla samic LUN, utrzymywała się również u samic LL, w tym zwiększona zawartość lipidów, podwyższony potencjał błony mitochondrialnej oraz zmieniony status redoks. Dodatkowo w oocytach samic LL stwierdzono obniżony poziom reaktywnych form tlenu względem grupy CC.

Na podstawie opisanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- Laktacja stanowi krytyczne postnatalne okno programowania osi rozrodczej u myszy: właściwe żywienie matki w tym czasie sprzyja prawidłowemu kształtowaniu zdrowia reprodukcyjnego potomstwa, a stres żywieniowy może inicjować wielopoziomowe przeprogramowanie osi HPG oraz sprzyjać utrwaleniu zaburzeń funkcji rozrodczych potomstwa w dorosłości.
- Stres żywieniowy doświadczony we wczesnym etapie życia wywołuje zależne od obszaru podwzgórza zmiany w ekspresji genów i białek istotnych dla regulacji osi HPG, wskazujące na adaptacyjne przestrojenie podwzgórzowych obwodów neuronalnych w odpowiedzi na modyfikacje sygnalizacji metabolicznej i rozrodczej.
- Zaburzenia sygnalizacji leptynowej w jądrze łukowatym podwzgórza (ARC), obejmujące obniżoną wrażliwość neuronów tego obszaru na stymulację wzrostu aksonów przez leptynę oraz zwiększoną ekspresję genu *Lepr* wskazują, że niedobór tego hormonu u zwierząt wystawionych na stres żywieniowy stanowi istotny element mechanizmu leżącego u podstaw skutków wczesnego stresu metabolicznego podczas laktacji.
- Niedożywienie matki w okresie laktacji działa jak sygnał środowiskowy, który prowadzi do przestawienia metabolizmu lipidów i modulacji maszynarii epigenetycznej w jajniku, skutkując długofalowym przeprogramowaniem gospodarki lipidowo-energetycznej komórki jajowej.
- Niedożywienie matki w okresie laktacji nie uruchamia jedynie krótkotrwałej odpowiedzi u potomstwa F1, lecz wywiera efekt o charakterze wielopokoleniowym. Najbardziej nasilone zmiany w zakresie akumulacji tkanki tłuszczowej, gospodarki lipidowej w jajniku i bioenergetyki komórki jajowej, obserwowane u potomstwa obojga rodziców narażonych na wczesny stres żywieniowy, wskazują na addytywny (kumulatywny) charakter oddziaływań rodzicielskich w programowaniu metabolizmu potomstwa. Ponadto zmiany metaboliczne w komórce jajowej mogą potencjalnie sprzyjać przenoszeniu tych efektów poza pokolenie F2.

7. Bibliografia

1. Aardema H, Lolicato F, van de Lest CH, Brouwers JF, Vaandrager AB, van Tol HT, Roelen BA, Vos PL, Helms JB, Gadella BM. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol Reprod*. 2013 Jun 27;88(6):164. doi: 10.1095/biolreprod.112.106062.
2. Abey NO, Ebuehi OAT, Imaga NOA. Intergenerational protein deficiency and adolescent reproductive function of subsequent female generations (F₁ and F₂) in rat model. *Curr Res Physiol*. 2021 Dec 22;5:16-24. doi: 10.1016/j.crphys.2021.12.003.
3. Acevedo-Rodriguez A, Kauffman AS, Cherrington BD, Borges CS, Roepke TA, Laconi M. Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. *J Neuroendocrinol*. 2018 Oct;30(10):e12590. doi: 10.1111/jne.12590.
4. Aguiar DD, Wunderlich ALM, Stopa LRS, Guergolette RP, Martins AB, Souza CF, da Silva ACV, Bissochi IMT, Forcato S, Aquino ABO, Zaia DAM, Zaia CTBV, de Andrade FG, Kiss ACI, Gerardin DCC, Uchôa ET, Leite CM. Postnatal undernutrition increases estradiol plasma levels and sexual receptivity and disrupts the kisspeptin-GnRH pathway in adult female rats. *Physiol Behav*. 2025 Apr 1;292:114817. doi: 10.1016/j.physbeh.2025.114817.
5. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest*. 1997 Feb 1;99(3):391-5. doi: 10.1172/JCI119172.
6. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-37. doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.413.
7. Aiken CE, Ozanne SE. Transgenerational developmental programming. *Hum Reprod Update*. 2014 Jan-Feb;20(1):63-75. doi: 10.1093/humupd/dmt043.
8. Aiken CE, Tarry-Adkins JL, Ozanne SE. Transgenerational effects of maternal diet on metabolic and reproductive ageing. *Mamm Genome*. 2016 Aug;27(7-8):430-9. doi: 10.1007/s00335-016-9631-1.
9. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5245-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
10. Anderson E, Lee G, Letourneau R, Albertini DF, Meller SM. Cytological observations of the ovarian epithelium in mammals during the reproductive cycle. *J Morphol*. 1976 Sep;150(1):135-65. doi: 10.1002/jmor.1051500107.
11. Andreas E, Reid M, Zhang W, Moley KH. The effect of maternal high-fat/high-sugar diet on offspring oocytes and early embryo development. *Mol Hum Reprod*. 2019 Nov 30;25(11):717-728. doi: 10.1093/molehr/gaz049.
12. Aparicio T, Kermorgant S, Darmoul D, Guilmeau S, Hormi K, Mahieu-Caputo D, Lehy T. Leptin and Ob-Rb receptor isoform in the human digestive tract during fetal development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Nov;90(11):6177-84. doi: 10.1210/jc.2005-1498.
13. Arena R, Bisogno S, Gąsior Ł, Rudnicka J, Bernhardt L, Haaf T, Zacchini F, Bochenek M, Fic K, Bik E, Barańska M, Bodzoń-Kuślakowska A, Suder P, Depciuch J, Gurgul A, Polański Z, Ptak GE. Lipid droplets in mammalian eggs are utilized during embryonic diapause. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 9;118(10):e2018362118. doi: 10.1073/pnas.2018362118.

14. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000 May;25(1):25-9. doi: 10.1038/75556.
15. Bachvarova R, De Leon V, Johnson A, Kaplan G, Paynton BV. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.* 1985 Apr;108(2):325-31. doi: 10.1016/0012-1606(85)90036-3.
16. Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology.* 2010 May;151(5):2233-43. doi: 10.1210/en.2009-1190.
17. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 1993 Jan;36(1):62-7. doi: 10.1007/BF00399095.
18. Barker DJ. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull.* 1997 Jan;53(1):96-108. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011609.
19. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
20. Batt RA, Everard DM, Gillies G, Wilkinson M, Wilson CA, Yeo TA. Investigation into the hypogonadism of the obese mouse (genotype ob/ob). *J Reprod Fertil.* 1982 Mar;64(2):363-71. doi: 10.1530/jrf.0.0640363.
21. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, Thornton J, Agarwal A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril.* 2004 Sep;82(3):593-600. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.02.121.
22. Bell KA, Wagner CL, Feldman HA, Shypailo RJ, Belfort MB. Associations of infant feeding with trajectories of body composition and growth. *Am J Clin Nutr.* 2017 Aug;106(2):491-498. doi: 10.3945/ajcn.116.151126.
23. Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci.* 2002 Oct 15;22(20):9048-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-20-09048.2002.
24. Bernal AB, Vickers MH, Hampton MB, Poynton RA, Sloboda DM. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. *PLoS One.* 2010 Dec 13;5(12):e15558. doi: 10.1371/journal.pone.0015558.
25. Bertavello PS, Teixeira-Gomes AP, Seyer A, Vitorino Carvalho A, Labas V, Blache MC, Banliat C, Cordeiro LAV, Duranthon V, Papillier P, Maillard V, Elis S, Uzbekova S. Lipid Identification and Transcriptional Analysis of Controlling Enzymes in Bovine Ovarian Follicle. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 20;19(10):3261. doi: 10.3390/ijms19103261.
26. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000 Oct;9(16):2395-402. doi: 10.1093/hmg/9.16.2395.
27. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6-21. doi: 10.1101/gad.947102.
28. Bittencourt Brasil F, Silva Faria T, Barcellos Sampaio FJ, da Fonte Ramos C. The effect of maternal malnutrition during lactation on the endometrial ERalpha expression, collagen type, and blood vessels in the rats offspring at puberty. *Anat Rec (Hoboken).* 2010 Jan;293(1):162-70. doi: 10.1002/ar.21028

29. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*. 2001 Dec 21;294(5551):2536-9. doi: 10.1126/science.1065848.
30. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*. 2004a Mar 17;24(11):2797-805. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004.
31. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. 2004b Apr 2;304(5667):108-10. doi: 10.1126/science.1095004.
32. Bouret SG, Gorski JN, Patterson CM, Chen S, Levin BE, Simerly RB. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab*. 2008 Feb;7(2):179-85. doi: 10.1016/j.cmet.2007.12.001.
33. Bouret SG. Leptin, nutrition, and the programming of hypothalamic feeding circuits. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2010;65:25-35; discussion 35-9. doi: 10.1159/000281143.
34. Bouret SG. Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity. *Int J Obes Suppl*. 2012 Dec;2(Suppl 2):S19-24. doi: 10.1038/ijosup.2012.17.
35. Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*. 1997 Jan;109(1):165-71. doi: 10.1530/jrf.0.1090165.
36. Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE, Woodruff TK. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Dev Biol*. 2006 Oct 1;298(1):132-48. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.025.
37. Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones ME, Simpson ER, Findlay JK. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology*. 2000 Jul;141(7):2614-23. doi: 10.1210/endo.141.7.7578.
38. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr*. 2007 Mar;97(3):435-9. doi: 10.1017/S0007114507352392.
39. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol*. 2006 Oct 10;498(5):712-26. doi: 10.1002/cne.21086.
40. Burton NO, Greer EL. Multigenerational epigenetic inheritance: Transmitting information across generations. *Semin Cell Dev Biol*. 2022 Jul;127:121-132. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.08.006.
41. Cao J, Mickens JA, McCaffrey KA, Leyrer SM, Patisaul HB. Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology*. 2012 Jan;33(1):23-36. doi: 10.1016/j.neuro.2011.11.002.
42. Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, Hara T, Hayashi J, Yonekawa H. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet*. 2007 Mar;39(3):386-90. doi: 10.1038/ng1970.
43. Caraty A, Franceschini I. Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. *Reprod Domest Anim*. 2008 Jul;43 Suppl 2:172-8. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01158.x.

44. Caron E, Ciofi P, Prevot V, Bouret SG. Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. *J Neurosci*. 2012 Aug 15;32(33):11486-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6074-11.2012.
45. Casabiell X, Piñeiro V, Tomé MA, Peinó R, Diéguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4270-3. doi: 10.1210/jcem.82.12.4590.
46. Castellano JM, Bentsen AH, Sánchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Romero M, Garcia-Galiano D, Aguilar E, Pinilla L, Diéguez C, Mikkelsen JD, Tena-Sempere M. Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. *Endocrinology*. 2011 Sep;152(9):3396-408. doi: 10.1210/en.2010-1415.
47. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C, Tena-Sempere M. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):3917-25. doi: 10.1210/en.2005-0337.
48. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castaño JP, Malagón MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Sep 26;257-258:75-83. doi: 10.1016/j.mce.2006.07.002
49. Cernea M, Phillips R, Padmanabhan V, Coolen LM, Lehman MN. Prenatal testosterone exposure decreases colocalization of insulin receptors in kisspeptin/neurokinin B/dynorphin and agouti-related peptide neurons of the adult ewe. *Eur J Neurosci*. 2016 Oct;44(8):2557-2568. doi: 10.1111/ejn.13373.
50. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*. 2002 Nov;124(5):675-81.
51. Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem*. 1979 Jun 10;254(11):4764-71.
52. Chatmethakul T, Schmelzel ML, Johnson KJ, Walker JR, Santillan DA, Colaizy TT, Roghair RD. Postnatal Leptin Levels Correlate with Breast Milk Leptin Content in Infants Born before 32 Weeks Gestation. *Nutrients*. 2022 Dec 8;14(24):5224. doi: 10.3390/nu14245224.
53. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 1996 Mar;12(3):318-20. doi: 10.1038/ng0396-318.
54. Chen L, Lu Y, Zhou YF, Wang Y, Zhan HF, Zhao YT, Wang YL, Zhang FF, Chen H, Li X. The effects of weight loss-related amenorrhea on women's health and the therapeutic approaches: a narrative review. *Ann Transl Med*. 2023 Jan 31;11(2):132. doi: 10.21037/atm-22-6366.
55. Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*. 1997 Oct;138(10):4489-92. doi: 10.1210/endo.138.10.5570.
56. Chongthammakun S, Terasawa E. Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized

- female rhesus monkeys. *Endocrinology*. 1993 Feb;132(2):735-43. doi: 10.1210/endo.132.2.8425492.
57. Chu DM, Meyer KM, Prince AL, Aagaard KM. Impact of maternal nutrition in pregnancy and lactation on offspring gut microbial composition and function. *Gut Microbes*. 2016 Nov;7(6):459-470. doi: 10.1080/19490976.2016.1241357.
 58. Clarkson J, Boon WC, Simpson ER, Herbison AE. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*. 2009 Jul;150(7):3214-20. doi: 10.1210/en.2008-1733.
 59. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 2008 Aug 27;28(35):8691-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1775-08.2008.
 60. Clarkson J, Han SK, Liu X, Lee K, Herbison AE. Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Aug 5;324(1-2):45-50. doi: 10.1016/j.mce.2010.01.026.
 61. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5817-25. doi: 10.1210/en.2006-0787.
 62. Clarkson J, Shamas S, Mallinson S, Herbison AE. Gonadal steroid induction of kisspeptin peptide expression in the rostral periventricular area of the third ventricle during postnatal development in the male mouse. *J Neuroendocrinol*. 2012 Jun;24(6):907-15. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02294.x.
 63. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978 Mar;14(3):141-8. doi: 10.1007/BF00429772.
 64. Colledge WH. Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides*. 2009 Jan;30(1):34-41. doi: 10.1016/j.peptides.2008.05.006.
 65. Conley AJ, Howard HJ, Slinger WD, Ford JJ. Steroidogenesis in the preovulatory porcine follicle. *Biol Reprod*. 1994 Oct;51(4):655-61. doi: 10.1095/biolreprod51.4.655.
 66. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *J Physiol*. 2012 May 1;590(9):2167-80. doi: 10.1113/jphysiol.2011.223305.
 67. Corbin CJ, Moran FM, Vidal JD, Ford JJ, Wise T, Mapes SM, Njar VC, Brodie AM, Conley AJ. Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. *Biol Reprod*. 2003 Aug;69(2):390-7. doi: 10.1095/biolreprod.103.015578.
 68. Cottrell EC, Martin-Gronert MS, Fernandez-Twinn DS, Luan J, Berends LM, Ozanne SE. Leptin-independent programming of adult body weight and adiposity in mice. *Endocrinology*. 2011 Feb;152(2):476-82. doi: 10.1210/en.2010-0911.
 69. Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol*. 2003 Jun;17(6):1039-53. doi: 10.1210/me.2002-0398.
 70. Cravo RM, Frazao R, Perello M, Osborne-Lawrence S, Williams KW, Zigman JM, Vianna C, Elias CF. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. *PLoS One*. 2013;8(3):e58698. doi: 10.1371/journal.pone.0058698.
 71. Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, Dahl HH, Chinnery PF. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis

- explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):249-54. doi: 10.1038/ng.2007.63.
72. da Silva Faria T, da Fonte Ramos C, Sampaio FJ. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *J Nutr Biochem.* 2004 Feb;15(2):123-7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2003.08.011.
73. de Oliveira JC, Grassioli S, Gravena C, de Mathias PC. Early postnatal low-protein nutrition, metabolic programming and the autonomic nervous system in adult life. *Nutr Metab (Lond).* 2012 Sep 11;9(1):80. doi: 10.1186/1743-7075-9-80.
74. Decourtye L, Clemessy M, Mire E, Ledent T, Périn L, Robinson IC, Le Bouc Y, Kappeler L. Impact of insulin on primary arcuate neurons culture is dependent on early-postnatal nutritional status and neuronal subpopulation. *PLoS One.* 2018 Feb 21;13(2):e0193196. doi: 10.1371/journal.pone.0193196.
75. Decourtye L, Mire E, Clemessy M, Heurtier V, Ledent T, Robinson IC, Mollard P, Epelbaum J, Meaney MJ, Garel S, Le Bouc Y, Kappeler L. IGF-1 Induces GHRH Neuronal Axon Elongation during Early Postnatal Life in Mice. *PLoS One.* 2017 Jan 11;12(1):e0170083. doi: 10.1371/journal.pone.0170083. Erratum in: *PLoS One.* 2017 Feb 21;12(2):e0172915. doi: 10.1371/journal.pone.0172915.
76. Decourtye-Espiard L, Clemessy M, Leneuve P, Mire E, Ledent T, Le Bouc Y, Kappeler L. Stimulation of GHRH Neuron Axon Growth by Leptin and Impact of Nutrition during Suckling in Mice. *Nutrients.* 2023 Feb 21;15(5):1077. doi: 10.3390/nu15051077
77. Desai M, Babu J, Gayle D, Day L, Beall M, Ross MG. Effects of maternal food restriction on offspring body composition. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Dec;189(6 Suppl):S227. doi: 10.1016/j.ajog.2003.10.622.
78. Di Bernardino C, Peserico A, Capacchietti G, Zappacosta A, Bernabò N, Russo V, Mauro A, El Khatib M, Gonnella F, Konstantinidou F, Stuppia L, Gatta V, Barboni B. High-Fat Diet and Female Fertility across Lifespan: A Comparative Lesson from Mammal Models. *Nutrients.* 2022 Oct 17;14(20):4341. doi: 10.3390/nu14204341.
79. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet.* 2004 Jul;75(1):106-11. doi: 10.1086/422103.
80. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013 Jan 1;29(1):15-21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
81. Donato J Jr, Cravo RM, Frazão R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, Richardson JA, Friedman J, Chua S Jr, Coppari R, Zigman JM, Elmquist JK, Elias CF. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest.* 2011 Jan;121(1):355-68. doi: 10.1172/JCI45106.
82. Downs SM, Mosey JL, Klinger J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2009 Sep;76(9):844-53. doi: 10.1002/mrd.21047.
83. Dror T, Franks J, Kauffman AS. Analysis of multiple positive feedback paradigms demonstrates a complete absence of LH surges and GnRH activation in mice lacking kisspeptin signaling. *Biol Reprod.* 2013 Jun 13;88(6):146. doi: 10.1095/biolreprod.113.108555.
84. Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology.* 2011 Jun;152(6):2228-36. doi: 10.1210/en.2010-1461.

85. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod*. 2010 Dec;83(6):909-18. doi: 10.1095/biolreprod.110.084145.
86. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*. 2014 Jul;148(1):R15-27. doi: 10.1530/REP-13-0251.
87. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med*. 2009 Sep;27(5):351-7. doi: 10.1055/s-0029-1237423.
88. Dupont C, Cordier AG, Junien C, Mandon-Pépin B, Levy R, Chavatte-Palmer P. Maternal environment and the reproductive function of the offspring. *Theriogenology*. 2012 Oct 15;78(7):1405-14. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.06.016.
89. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*. 1999 Aug;23(4):775-86. doi: 10.1016/s0896-6273(01)80035-0.
90. Elias SG, van Noord PA, Peeters PH, den Tonkelaar I, Grobbee DE. Caloric restriction reduces age at menopause: the effect of the 1944-1945 Dutch famine. *Menopause*. 2003 Sep-Oct;10(5):399-405. doi: 10.1097/01.GME.0000059862.93639.C1.
91. Elias SG, van Noord PA, Peeters PH, den Tonkelaar I, Kaaks R, Grobbee DE. Menstruation during and after caloric restriction: the 1944-1945 Dutch famine. *Fertil Steril*. 2007 Oct;88(4 Suppl):1101-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.12.043.
92. Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology*. 1994 Apr;134(4):1806-11. doi: 10.1210/endo.134.4.8137746.
93. Evelein AM, Visseren FL, van der Ent CK, Grobbee DE, Uiterwaal CS. Excess early postnatal weight gain leads to increased abdominal fat in young children. *Int J Pediatr*. 2012;2012:141656. doi: 10.1155/2012/141656.
94. Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2007 Nov;98(5):922-8. doi: 10.1017/S0007114507750924.
95. Faria Tda S, Brasil Fde B, Sampaio FJ, Ramos Cda F. Maternal malnutrition during lactation alters the folliculogenesis and gonadotropins and estrogen isoforms ovarian receptors in the offspring at puberty. *J Endocrinol*. 2008 Sep;198(3):625-34. doi: 10.1677/JOE-08-0121
96. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(8):1093-103. doi: 10.1172/JCI15693.
97. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*. 1997 Feb;18(1):71-106. doi: 10.1210/edrv.18.1.0290.
98. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001 Sep;108(6):785-91. doi: 10.1172/JCI14006.

99. Findlay JK, Drummond AE, Britt KL, Dyson M, Wreford NG, Robertson DM, Groome NP, Jones ME, Simpson ER. The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 May 25;163(1-2):81-7. doi: 10.1016/s0303-7207(99)00243-9.
100. Findlay JK, Dunning KR, Gilchrist RB, Hutt KJ, Russell DL, Walters KA. Follicle Selection in Mammalian Ovaries. In: Leung PCK, Adashi EY, editors. *The Ovary*. 3rd ed. London: Academic Press; 2019. p. 3-21.
101. Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 9;95(12):6965-70. doi: 10.1073/pnas.95.12.6965.
102. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994.
103. Frisch RE, McArthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science.* 1974 Sep 13;185(4155):949-51. doi: 10.1126/science.185.4155.949.
104. Frisch RE, Revelle R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science.* 1970 Jul 24;169(3943):397-9. doi: 10.1126/science.169.3943.397.
105. Frisch RE. Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed Proc.* 1980 May 15;39(7):2395-400.
106. Fu LY, van den Pol AN. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci.* 2010 Jul 28;30(30):10205-19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2098-10.2010.
107. Gaccioli F, Lager S, Powell TL, Jansson T. Placental transport in response to altered maternal nutrition. *J Dev Orig Health Dis.* 2013 Apr;4(2):101-15. doi: 10.1017/S2040174412000529.
108. Gallo LA, Tran M, Moritz KM, Jefferies AJ, Wlodek ME. Pregnancy in aged rats that were born small: cardiorenal and metabolic adaptations and second-generation fetal growth. *FASEB J.* 2012 Oct;26(10):4337-47. doi: 10.1096/fj.12-210401.
109. Galusca B, Gay A, Belleton G, Eisinger M, Massoubre C, Lang F, Grouselle D, Estour B, Germain N. Mechanisms and predictors of menses resumption once normal weight is reached in anorexia nervosa. *J Eat Disord.* 2023 Sep 29;11(1):172. doi: 10.1186/s40337-023-00893-x.
110. Gao J, Liu M, Liu J, Shi P, Cui H, Zhao S, Zhang X, Tao C. Effect of high-fat diet on the lipid profile of ovarian granulosa cells and female reproduction in mice. *PLoS One.* 2023 Jun 27;18(6):e0287534. doi: 10.1371/journal.pone.0287534.
111. García AP, Palou M, Sánchez J, Priego T, Palou A, Picó C. Moderate caloric restriction during gestation in rats alters adipose tissue sympathetic innervation and later adiposity in offspring. *PLoS One.* 2011 Feb 18;6(2):e17313. doi: 10.1371/journal.pone.0017313.
112. Georgakoudi I, Quinn KP. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state. *Annu Rev Biomed Eng.* 2012;14:351-67. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150108.
113. Ghizzoni L, Barreca A, Mastorakos G, Furlini M, Vottero A, Ferrari B, Chrousos GP, Bernasconi S. Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells. *Horm Metab Res.* 2001 Jun;33(6):323-8. doi: 10.1055/s-2001-15419.

114. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 2008 Jul 3;359(1):61-73. doi: 10.1056/NEJMra0708473.
115. Gluckman PD, Lillycrop KA, Vickers MH, Pleasants AB, Phillips ES, Beedle AS, Burdge GC, Hanson MA. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 31;104(31):12796-800. doi: 10.1073/pnas.0705667104.
116. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:481-514. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721.
117. González-Recio O, Ugarte E, Bach A. Trans-generational effect of maternal lactation during pregnancy: a Holstein cow model. *PLoS One*. 2012;7(12):e51816. doi: 10.1371/journal.pone.0051816.
118. Goodman RL, Coolen LM, Anderson GM, Hardy SL, Valent M, Connors JM, Fitzgerald ME, Lehman MN. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2959-67. doi: 10.1210/en.2003-1305.
119. Goodman RL, Inskeep EK. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 2006.
120. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*. 2007 Dec;148(12):5752-60. doi: 10.1210/en.2007-0961.
121. Gu LJ, Li L, Li QN, Xu K, Yue W, Qiao JY, Meng TG, Dong MZ, Lei WL, Guo JN, Wang ZB, Sun QY. The transgenerational effects of maternal low-protein diet during lactation on offspring. *J Genet Genomics*. 2024 Aug;51(8):824-835. doi: 10.1016/j.jgg.2024.04.008.
122. Guergolette RP, Aguiar DD, Stopa LRS, Souza CF, Wunderlich ALM, Zaia DAM, Zaia CTBV, Leite CM, Uchoa ET. Early maternal undernutrition induces sex-related metabolic changes in adult offspring. *J Dev Orig Health Dis*. 2025 Jan 21;16:e4. doi: 10.1017/S2040174424000448.
123. Guzmán C, García-Becerra R, Aguilar-Medina MA, Méndez I, Merchant-Larios H, Zambrano E. Maternal protein restriction during pregnancy and/or lactation negatively affects follicular ovarian development and steroidogenesis in the prepubertal rat offspring. *Arch Med Res*. 2014 May;45(4):294-300. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.05.005.
124. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 1991 Oct 26;303(6809):1019-22. doi: 10.1136/bmj.303.6809.1019.
125. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001;60:5-20. doi: 10.1093/bmb/60.1.5.
126. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992 Jul;35(7):595-601. doi: 10.1007/BF00400248.
127. Halpin DM, Jones A, Fink G, Charlton HM. Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. *J Reprod Fertil*. 1986 May;77(1):287-96. doi: 10.1530/jrf.0.0770287.
128. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin

- as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 2005 Dec 7;25(49):11349-56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005.
129. Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Oct 31;156(2):668-74. doi: 10.1016/s0006-291x(88)80894-5.
 130. Herbison AE. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev*. 2008 Mar;57(2):277-87. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.006.
 131. Hill JW, Elias CF, Fukuda M, Williams KW, Berglund ED, Holland WL, Cho YR, Chuang JC, Xu Y, Choi M, Lauzon D, Lee CE, Coppari R, Richardson JA, Zigman JM, Chua S, Scherer PE, Lowell BB, Brüning JC, Elmquist JK. Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab*. 2010 Apr 7;11(4):286-97. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.002.
 132. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*. 1994 Apr;100(1-2):51-4. doi: 10.1016/0303-7207(94)90278-x.
 133. Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod*. 1994 Feb;9(2):188-91. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138480.
 134. Hillier SG. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Jun 20;179(1-2):39-46. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00469-5.
 135. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*. 1991;124:43-101. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61524-7.
 136. Hohos NM, Elliott EM, Monks J, Skaznik-Wikiel E. High-fat diet leads to increased ovarian lipid deposition even in the absence of obesity. *Fertil Steril*. 2019 112(3), e383–e384. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.07.1098
 137. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975 Jan 24;187(4173):226-32.
 138. Howie GJ, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2012 Jul;108(2):298-307. doi: 10.1017/S000711451100554X.
 139. Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao HT, Tsai MY, Chang C. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 3;101(31):11209-14. doi: 10.1073/pnas.0404372101.
 140. Huang J, Zhang Z, Wu Y, Wang Y, Wang J, Zhou L, Ni Z, Hao L, Yang N, Yang X. Early feeding of larger volumes of formula milk is associated with greater body weight or overweight in later infancy. *Nutr J*. 2018 Jan 24;17(1):12. doi: 10.1186/s12937-018-0322-5.
 141. Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987 Aug 14;146(3):1405-12. doi: 10.1016/0006-291x(87)90806-0.
 142. Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchon MR, McConnell J. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse

- oocytes and zygotes. *PLoS One*. 2010 Apr 9;5(4):e10074. doi: 10.1371/journal.pone.0010074.
143. Ireland JJ. Control of follicular growth and development. *J Reprod Fertil Suppl*. 1987;34:39-54.
 144. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Fujisawa S, Kinouchi R, Gereltsetseg G, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Effects of intrauterine undernutrition on hypothalamic Kiss1 expression and the timing of puberty in female rats. *J Physiol*. 2010 Mar 1;588(Pt 5):821-9. doi: 10.1113/jphysiol.2009.183558.
 145. Iyare EE, Adegoke OA, Nwagha UI. Mechanism of delayed puberty in rats whose mothers consumed *Hibiscus sabdariffa* during lactation. *Pharm Biol*. 2010 Oct;48(10):1170-6. doi: 10.3109/13880200903567120.
 146. Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, Sidiropoulos K, Cook J, Gillespie M, Haw R, Loney F, May B, Milacic M, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Weiser J, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 8;48(D1):D498-D503. doi: 10.1093/nar/gkz1031.
 147. Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;301:203-25. doi: 10.1007/3-540-31390-7_7.
 148. Ji H, Zhang Q, Ding L, Chen R, Liu F, Li P. Structural and metabolic cumulus cell alteration affects oocyte quality in underweight women. *Zygote*. 2024 Feb;32(1):77-86. doi: 10.1017/S0967199423000588.
 149. Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, Pentinat-Pelegrin T, Faucette RR, Otis JP, Chow A, Diaz R, Ferguson-Smith A, Patti ME. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes*. 2009 Feb;58(2):460-8. doi: 10.2337/db08-0490.
 150. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 2007 Apr;8(4):253-62. doi: 10.1038/nrg2045.
 151. Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Bilski JJ, Grazul-Bilska AT. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. *Endocrine*. 2002 Aug;18(3):261-70. doi: 10.1385/ENDO:18:3:261.
 152. Kaczmarek MM, Mendoza T, Kozak LP. Lactation undernutrition leads to multigenerational molecular programming of hypothalamic gene networks controlling reproduction. *BMC Genomics*. 2016 May 4;17:333. doi: 10.1186/s12864-016-2615-4.
 153. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jan 1;28(1):27-30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.
 154. Kauffman AS, Navarro VM, Kim J, Clifton DK, Steiner RA. Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Nov;297(5):E1212-21. doi: 10.1152/ajpendo.00461.2009.
 155. Kauffman AS. Coming of age in the kisspeptin era: sex differences, development, and puberty. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Aug 5;324(1-2):51-63. doi: 10.1016/j.mce.2010.01.017.
 156. Kelder T, van Iersel MP, Hanspers K, Kutmon M, Conklin BR, Evelo CT, Pico AR. WikiPathways: building research communities on biological pathways. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40(Database issue):D1301-7. doi: 10.1093/nar/gkr1074.

157. Khan AR, Kauffman AS. The role of kisspeptin and RFamide-related peptide-3 neurones in the circadian-timed preovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol.* 2012 Jan;24(1):131-43. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02162.x.
158. Khan R, Jiang X, Hameed U, Shi Q. Role of Lipid Metabolism and Signaling in Mammalian Oocyte Maturation, Quality, and Acquisition of Competence. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Mar 5;9:639704. doi: 10.3389/fcell.2021.639704.
159. Khorram O, Keen-Rinehart E, Chuang TD, Ross MG, Desai M. Maternal undernutrition induces premature reproductive senescence in adult female rat offspring. *Fertil Steril.* 2015 Jan;103(1):291-8.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.026.
160. Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction.* 2002 May;123(5):613-20. doi: 10.1530/rep.0.1230613.
161. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
162. Kozak LP, Newman S, Chao PM, Mendoza T, Koza RA. The early nutritional environment of mice determines the capacity for adipose tissue expansion by modulating genes of caveolae structure. *PLoS One.* 2010 Jun 21;5(6):e11015. doi: 10.1371/journal.pone.0011015.
163. Kunz C, Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin Perinatol.* 1999 Jun;26(2):307-33.
164. Lacal I, Ventura R. Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives. *Front Mol Neurosci.* 2018 Sep 28;11:292. doi: 10.3389/fnmol.2018.00292.
165. Lehman MN, Hileman SM, Goodman RL. Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. *Adv Exp Med Biol.* 2013;784:27-62. doi: 10.1007/978-1-4614-6199-9_3.
166. Léonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod.* 2003 Feb;68(2):390-400. doi: 10.1095/biolreprod.102.003269.
167. Li Q, Guo S, Yang C, Liu X, Chen X, He J, Tong C, Ding Y, Peng C, Geng Y, Mu X, Liu T, Li F, Wang Y, Gao R. High-fat diet-induced obesity primes fatty acid β -oxidation impairment and consequent ovarian dysfunction during early pregnancy. *Ann Transl Med.* 2021 May;9(10):887. doi: 10.21037/atm-21-2027.
168. Li R, Phillips DM, Mather JP. Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology.* 1995 Mar;136(3):849-56. doi: 10.1210/endo.136.3.7867593.
169. Li XF, Lin YS, Kinsey-Jones JS, O'Byrne KT. High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats. *Endocrinology.* 2012 Sep;153(9):4422-31. doi: 10.1210/en.2012-1223.
170. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014 Apr 1;30(7):923-30. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
171. Lian J, Nelson R, Lehner R. Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. *Protein Cell.* 2018 Feb;9(2):178-195. doi: 10.1007/s13238-017-0437-z.
172. Lin YJ, Tsai CC, Huang LT, Sheen JM, Tiao MM, Yu HR, Chen CC, Tain YL. Detrimental effect of maternal and post-weaning high-fat diet on the reproductive function in the adult female offspring rat: roles of insulin-like growth factor 2 and the ovarian circadian clock. *J Assist Reprod Genet.* 2017 Jun;34(6):817-826. doi: 10.1007/s10815-017-0915-5.

173. Longo M, Liuzzi F, De Carlini S, La Marca A. The role of LH in follicle development: from physiology to new clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol*. 2025 Feb 10;23(Suppl 1):22. doi: 10.1186/s12958-025-01353-8.
174. López-Bendito G, Cautinat A, Sánchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marín O, Garel S. Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell*. 2006 Apr 7;125(1):127-42. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.042.
175. Lopuhaä CE, Roseboom TJ, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP, van der Zee JS, van der Meulen JH. Atopy, lung function, and obstructive airways disease after prenatal exposure to famine. *Thorax*. 2000 Jul;55(7):555-61. doi: 10.1136/thorax.55.7.555.
176. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
177. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11162-6. doi: 10.1073/pnas.90.23.11162.
178. Lumey LH, Stein AD. In utero exposure to famine and subsequent fertility: The Dutch Famine Birth Cohort Study. *Am J Public Health*. 1997 Dec;87(12):1962-6. doi: 10.2105/ajph.87.12.1962.
179. Macklon NS, Fauser BC. Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. *Arch Med Res*. 2001 Nov-Dec;32(6):595-600. doi: 10.1016/s0188-4409(01)00327-7.
180. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*. 2010 Jan;13(1):133-40. doi: 10.1038/nn.2467.
181. Malhotra A, Allison BJ, Castillo-Melendez M, Jenkin G, Polglase GR, Miller SL. Neonatal Morbidities of Fetal Growth Restriction: Pathophysiology and Impact. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Feb 7;10:55. doi: 10.3389/fendo.2019.00055.
182. Manfredi-Lozano M, Roa J, Ruiz-Pino F, Piet R, Garcia-Galiano D, Pineda R, Zamora A, Leon S, Sanchez-Garrido MA, Romero-Ruiz A, Dieguez C, Vazquez MJ, Herbison AE, Pinilla L, Tena-Sempere M. Defining a novel leptin-melanocortin-kisspeptin pathway involved in the metabolic control of puberty. *Mol Metab*. 2016 Aug 11;5(10):844-857. doi: 10.1016/j.molmet.2016.08.003.
183. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 2011, 17(1), pp. 10-12. doi: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
184. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Nov;6(11):838-49. doi: 10.1038/nrm1761.
185. Martínez-Uña M, López-Mancheño Y, Diéguez C, Fernández-Rojo MA, Novelle MG. Unraveling the Role of Leptin in Liver Function and Its Relationship with Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 9;21(24):9368. doi: 10.3390/ijms21249368.
186. Martins IP, de Oliveira JC, Pavanello A, Matusso CCI, Previante C, Tófolo LP, Ribeiro TA, da Silva Franco CC, Miranda RA, Prates KV, Alves VS, Francisco FA, de Moraes AMP, de Freitas Mathias PC, Malta A. Protein-restriction diet during the suckling phase programs rat metabolism against obesity and insulin resistance exacerbation induced by a high-fat

- diet in adulthood. *J Nutr Biochem.* 2018 Jul;57:153-161. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.03.017.
187. Matsuzaki T, Douchi T, Oki T, Ishihara O, Okagaki R, Kajihara T, Tamura M, Kotsuji F, Tajima K, Kawano M, Ishizuka B, Irahara M. Weight reduction using a formula diet recovers menstruation in obese patients with an ovulatory disorder. *Reprod Med Biol.* 2017 Jul 7;16(3):268-275. doi: 10.1002/rmb2.12034.
 188. Maynard RL, Downes N. Female reproductive tract. In: Maynard RL, Downes N, editors. *Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research.* Academic Press; 2019. p. 219-229. doi:10.1016/B978-0-12-811837-5.00019-8.
 189. May-Panloup P, Chrétien MF, Jacques C, Vasseur C, Malthièry Y, Reynier P. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2005 Mar;20(3):593-7. doi: 10.1093/humrep/deh667.
 190. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil.* 2000 Jan;118(1):163-70.
 191. McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJ. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod.* 1997 Nov;57(5):990-8. doi: 10.1095/biolreprod57.5.990.
 192. McPherson NO, Bell VG, Zander-Fox DL, Fullston T, Wu LL, Robker RL, Lane M. When two obese parents are worse than one! Impacts on embryo and fetal development. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 Sep 15;309(6):E568-81. doi: 10.1152/ajpendo.00230.2015.
 193. Meikle D, Westberg M. Maternal nutrition and reproduction of daughters in wild house mice (*Mus musculus*). *Reproduction.* 2001 Sep;122(3):437-42. doi: 10.1530/rep.0.1220437.
 194. Mezei GC, Ural SH, Hajnal A. Differential Effects of Maternal High Fat Diet During Pregnancy and Lactation on Taste Preferences in Rats. *Nutrients.* 2020 Nov 20;12(11):3553. doi: 10.3390/nu12113553.
 195. Miró F, Smyth CD, Hillier SG. Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1991 Dec;129(6):3388-94. doi: 10.1210/endo-129-6-3388.
 196. Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology.* 1990 Sep;127(3):1375-84. doi: 10.1210/endo-127-3-1375.
 197. Moenter SM, DeFazio RA. Endogenous gamma-aminobutyric acid can excite gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 2005 Dec;146(12):5374-9. doi: 10.1210/en.2005-0788.
 198. Mørkve Knudsen T, Rezwan FI, Jiang Y, Karmaus W, Svanes C, Holloway JW. Transgenerational and intergenerational epigenetic inheritance in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Sep;142(3):765-772. doi: 10.1016/j.jaci.2018.07.007.
 199. Moschonis G, Halilagic A, Karaglani E, Mavrogianni C, Mourouti N, Collins CE, Manios Y. Likelihood of obesity in early and late childhood based on growth trajectory during infancy. *Int J Obes (Lond).* 2023 Jul;47(7):651-658. doi: 10.1038/s41366-023-01310-8.
 200. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology.* 1997 Mar;138(3):1190-3. doi: 10.1210/endo.138.3.5024.

201. Musha Y, Itoh S, Miyakawa M, Ohtsuji M, Hanson MA, Kinoshita K, Takeda S. Vascular, renal and placental effects on pregnant offspring of protein-restricted rat dams. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Apr;37(4):343-51. doi: 10.1111/j.1447-0756.2010.01351.x.
202. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 2004 Oct;145(10):4565-74. doi: 10.1210/en.2004-0413.
203. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci.* 2009 Sep 23;29(38):11859-66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1569-09.2009.
204. Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, García-Galiano D, Hobbs SJ, Manfredi-Lozano M, León S, Sangiao-Alvarellos S, Castellano JM, Clifton DK, Pinilla L, Steiner RA, Tena-Sempere M. Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J Neurosci.* 2012 Feb 15;32(7):2388-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4288-11.2012.
205. Nestor CC, Briscoe AM, Davis SM, Valent M, Goodman RL, Hileman SM. Evidence of a role for kisspeptin and neurokinin B in puberty of female sheep. *Endocrinology.* 2012 Jun;153(6):2756-65. doi: 10.1210/en.2011-2009.
206. Nilsson EE, Skinner MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod.* 2002 Sep;67(3):1018-24. doi: 10.1095/biolreprod.101.002527.
207. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev.* 2009 Oct;30(6):713-43. doi: 10.1210/er.2009-0005.
208. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999 Oct 29;99(3):247-57. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81656-6.
209. Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol.* 2006 Oct;20(10):2456-68. doi: 10.1210/me.2005-0357.
210. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;26(6):711-23. doi: 10.1016/j.beem.2012.05.003.
211. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3686-95. doi: 10.1210/jcem.84.10.5999.
212. Padilla SL, Johnson CW, Barker FD, Patterson MA, Palmiter RD. A Neural Circuit Underlying the Generation of Hot Flushes. *Cell Rep.* 2018 Jul 10;24(2):271-277. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.037.
213. Painter RC, Osmond C, Gluckman P, Hanson M, Phillips DI, Roseboom TJ. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG.* 2008 Sep;115(10):1243-9. doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.01822.x.

214. Pakarainen T, Zhang FP, Nurmi L, Poutanen M, Huhtaniemi I. Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles. *Mol Endocrinol*. 2005 Oct;19(10):2591-602. doi: 10.1210/me.2005-0075.
215. Palou A, Picó C. Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life. *Appetite*. 2009 Feb;52(1):249-52. doi: 10.1016/j.appet.2008.09.013.
216. Palou M, Torrens JM, Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C. Moderate caloric restriction in lactating rats programs their offspring for a better response to HF diet feeding in a sex-dependent manner. *J Nutr Biochem*. 2011 Jun;22(6):574-84. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.05.001.
217. Patterson CM, Bouret SG, Park S, Irani BG, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. *Endocrinology*. 2010 Sep;151(9):4270-9. doi: 10.1210/en.2010-0401.
218. Pavlidou E, Papandreou D, Taha Z, Mantzorou M, Tyrovolas S, Kiortsis DN, Psara E, Papadopoulou SK, Yfantis M, Spanoudaki M, Antasouras G, Mentzelou M, Giaginis C. Association of Maternal Pre-Pregnancy Overweight and Obesity with Childhood Anthropometric Factors and Perinatal and Postnatal Outcomes: A Cross-Sectional Study. *Nutrients*. 2023 Jul 29;15(15):3384. doi: 10.3390/nu15153384.
219. Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. Amsterdam: Academic Press; 2012.
220. Petrino JCP, Franci CR, Del Bianco-Borges B. Leptin actions through the nitrenergic system to modulate the hypothalamic expression of the kiss1 mRNA in the female rat. *Brain Res*. 2020 Feb 1;1728:146574. doi: 10.1016/j.brainres.2019.146574.
221. Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Mar;114(5):381-92. doi: 10.1042/CS20070302.
222. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 2012 Jul;92(3):1235-316. doi: 10.1152/physrev.00037.2010.
223. Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dörner G. Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997 Jun;21(6):451-6. doi: 10.1038/sj.ijo.0800429.
224. Przygodzka E, Bhinderwala F, Powers R, McFee RM, Cupp AS, Wood JR, Davis JS. Metabolic control of luteinizing hormone-responsive ovarian steroidogenesis. *J Biol Chem*. 2025 Jan;301(1):108042. doi: 10.1016/j.jbc.2024.108042.
225. Ramadan AG, Abdel-Rehim WM, El-Tahan RA, Elblehi SS, Kamel MA, Shaker SA. Maternal and paternal obesity differentially reprogram the ovarian mitochondrial biogenesis of F1 female rats. *Sci Rep*. 2023 Sep 19;13(1):15480. doi: 10.1038/s41598-023-42468-5.
226. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*. 1998 Jan 17;351(9097):173-7. doi: 10.1016/s0140-6736(97)07244-9.
227. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr*. 1999 Nov;70(5):811-6. doi: 10.1093/ajcn/70.5.811.

228. Reichetzeder C, Dwi Putra SE, Li J, Hocher B. Developmental Origins of Disease - Crisis Precipitates Change. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(3):919-38. doi: 10.1159/000447801.
229. Richani D, Dunning KR, Thompson JG, Gilchrist RB. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Hum Reprod Update*. 2021 Jan 4;27(1):27-47. doi: 10.1093/humupd/dmaa043.
230. Ringrose L, Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet*. 2004;38:413-43. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091907.
231. Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:145-66. doi: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902.
232. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*. 2008 Jan;29(1):48-69. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.07.002.
233. Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2009 Aug;150(8):3664-71. doi: 10.1210/en.2009-0247.
234. Rochester D, Jain A, Polotsky AJ, Polotsky H, Gibbs K, Isaac B, Zeitlian G, Hickmon C, Feng S, Santoro N. Partial recovery of luteal function after bariatric surgery in obese women. *Fertil Steril*. 2009 Oct;92(4):1410-1415. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.025.
235. Roepke TA, Yasrebi A, Villalobos A, Krumm EA, Yang JA, Mamounis KJ. Loss of ER α partially reverses the effects of maternal high-fat diet on energy homeostasis in female mice. *Sci Rep*. 2017 Jul 25;7(1):6381. doi: 10.1038/s41598-017-06560-x.
236. Rogers EH, Hunter ES, Rosen MB, Rogers JM, Lau C, Hartig PC, Francis BM, Chernoff N. Lack of evidence for intergenerational reproductive effects due to prenatal and postnatal undernutrition in the female CD-1 mouse. *Reprod Toxicol*. 2003 Sep-Oct;17(5):519-25. doi: 10.1016/s0890-6238(03)00070-4.
237. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP. Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr*. 2000 Nov;72(5):1101-6. doi: 10.1093/ajcn/72.5.1101.
238. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Dec 20;185(1-2):93-8. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00721-3.
239. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*. 2012 Oct;7(10):1098-108. doi: 10.4161/epi.21975.
240. Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, Saudek V, Semple RK, Dash S, Hyden CS, Bottomley W, Vigouroux C, Magré J, Raymond-Barker P, Murgatroyd PR, Chawla A, Skepper JN, Chatterjee VK, Suliman S, Patch AM, Agarwal AK, Garg A, Barroso I, Cinti S, Czech MP, Argente J, O'Rahilly S, Savage DB; LD Screening Consortium. Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEC. *EMBO Mol Med*. 2009 Aug;1(5):280-7. doi: 10.1002/emmm.200900037.
241. Saben JL, Boudoures AL, Asghar Z, Thompson A, Drury A, Zhang W, Chi M, Cusumano A, Scheaffer S, Moley KH. Maternal Metabolic Syndrome Programs Mitochondrial Dysfunction via Germline Changes across Three Generations. *Cell Rep*. 2016 Jun 28;16(1):1-8. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.065.

242. Sanchez J, Oliver P, Miralles O, Ceresi E, Picó C, Palou A. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology*. 2005 Jun;146(6):2575-82. doi: 10.1210/en.2005-0112.
243. Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V, Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Mol Endocrinol*. 2014 Sep;28(9):1502-21. doi: 10.1210/me.2014-1049.
244. Santos TA, El Shourbagy S, St John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2006 Mar;85(3):584-91. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.09.017.
245. Sarkar DK, Chiappa SA, Fink G, Sherwood NM. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*. 1976 Dec 2;264(5585):461-3. doi: 10.1038/264461a0.
246. Sarkar DK, Fink G. Luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk plasma from long-term ovariectomized rats: effects of steroids. *J Endocrinol*. 1980 Sep;86(3):511-24. doi: 10.1677/joe.0.0860511.
247. Sasaki H, Hamatani T, Kamijo S, Iwai M, Kobanawa M, Ogawa S, Miyado K, Tanaka M. Impact of Oxidative Stress on Age-Associated Decline in Oocyte Developmental Competence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Nov 22;10:811. doi: 10.3389/fendo.2019.00811.
248. Sathishkumar K, Elkins R, Yallampalli U, Yallampalli C. Protein restriction during pregnancy induces hypertension in adult female rat offspring--influence of oestradiol. *Br J Nutr*. 2012 Mar;107(5):665-73. doi: 10.1017/S0007114511003448.
249. Schroeder M, Kronfeld-Schor N, Weller A. Selective leptin insensitivity and alterations in female-reproductive patterns linked to hyperleptinemia during infancy. *PLoS One*. 2013;8(3):e59937. doi: 10.1371/journal.pone.0059937.
250. Schutt AK, Blesson CS, Hsu JW, Valdes CT, Gibbons WE, Jahoor F, Yallampalli C. Preovulatory exposure to a protein-restricted diet disrupts amino acid kinetics and alters mitochondrial structure and function in the rat oocyte and is partially rescued by folic acid. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019 Jan 17;17(1):12. doi: 10.1186/s12958-019-0458-y.
251. Scott R 3rd, Zhang M, Seli E. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: implications for assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2018 Jun;30(3):163-170. doi: 10.1097/GCO.0000000000000455.
252. Selesniemi K, Lee HJ, Muhlhauser A, Tilly JL. Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 26;108(30):12319-24. doi: 10.1073/pnas.1018793108.
253. Semaan SJ, Kauffman AS. Daily successive changes in reproductive gene expression and neuronal activation in the brains of pubertal female mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Feb 5;401:84-97. doi: 10.1016/j.mce.2014.11.025.
254. Semaan SJ, Kauffman AS. Developmental sex differences in the peri-pubertal pattern of hypothalamic reproductive gene expression, including *Kiss1* and *Tac2*, may contribute to sex differences in puberty onset. *Mol Cell Endocrinol*. 2022 Jul 1;551:111654. doi: 10.1016/j.mce.2022.111654.
255. Semaan SJ, Murray EK, Poling MC, Dhamija S, Forger NG, Kauffman AS. BAX-dependent and BAX-independent regulation of *Kiss1* neuron development in mice. *Endocrinology*. 2010 Dec;151(12):5807-17. doi: 10.1210/en.2010-0783.
256. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB,

- Slaughaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003 Oct 23;349(17):1614-27. doi: 10.1056/NEJMoa035322.
257. Sen A, Caiazza F. Oocyte maturation: a story of arrest and release. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013 Jan 1;5(2):451-77. doi: 10.2741/s383.
258. Senner CE. The role of DNA methylation in mammalian development. *Reprod Biomed Online*. 2011 Jun;22(6):529-35. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.02.016.
259. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 8;102(6):2129-34. doi: 10.1073/pnas.0409822102.
260. Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 3;103(1):224-9. doi: 10.1073/pnas.0506736102.
261. Silvestris E, de Pergola G, Rosania R, Loverro G. Obesity as disruptor of the female fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Mar 9;16(1):22. doi: 10.1186/s12958-018-0336-z.
262. Sirard MA. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Jun;28(6):483-8. doi: 10.1007/s10815-011-9554-4.
263. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Apr;21(4):214-22. doi: 10.1016/j.tem.2009.12.007.
264. Skinner MK. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod Toxicol*. 2008 Jan;25(1):2-6. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.09.001.
265. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*. 2006 Apr;18(4):298-303. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x.
266. Skowronski AA, Shaulson ED, Leibel RL, LeDuc CA. The postnatal leptin surge in mice is variable in both time and intensity and reflects nutritional status. *Int J Obes (Lond)*. 2022 Jan;46(1):39-49. doi: 10.1038/s41366-021-00957-5.
267. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):3686-92. doi: 10.1210/en.2005-0488.
268. Støving RK, Hangaard J, Hansen-Nord M, Hagen C. A review of endocrine changes in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res*. 1999 Mar-Apr;33(2):139-52. doi: 10.1016/s0022-3956(98)00049-1.
269. Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol*. 2005 Mar 1;279(1):20-30. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.11.027.
270. Sui S, He B, Jia Y, Li R, Cai D, Li X, Song H, Jia L, Zhao R. Maternal protein restriction during gestation and lactation programs offspring ovarian steroidogenesis and folliculogenesis in the prepubertal gilts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014 Sep;143:267-76. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.010.
271. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*. 2003 Jul;126(1):27-34. doi: 10.1530/rep.0.1260027.

272. Szostaczuk N, Priego T, Palou M, Palou A, Picó C. Oral leptin supplementation throughout lactation in rats prevents later metabolic alterations caused by gestational calorie restriction. *Int J Obes (Lond)*. 2017 Mar;41(3):360-371. doi: 10.1038/ijo.2016.241.
273. Takumi K, Iijima N, Ozawa H. Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus. *J Mol Neurosci*. 2011 Feb;43(2):138-45. doi: 10.1007/s12031-010-9430-1.
274. Tan TCY, Dunning KR. Non-invasive assessment of oocyte developmental competence. *Reprod Fertil Dev*. 2022 Dec;35(2):39-50. doi: 10.1071/RD22217.
275. Tang SB, Zhang TT, Yin S, Shen W, Luo SM, Zhao Y, Zhang CL, Klinger FG, Sun QY, Ge ZJ. Inheritance of perturbed methylation and metabolism caused by uterine malnutrition via oocytes. *BMC Biol*. 2023 Feb 24;21(1):43. doi: 10.1186/s12915-023-01545-x.
276. Tena-Sempere M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology*. 2007;86(3):229-41. doi: 10.1159/000108410.
277. Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod*. 2009 Dec;15(12):795-803. doi: 10.1093/molehr/gap073.
278. Tuscher JJ, Day JJ. Multigenerational epigenetic inheritance: One step forward, two generations back. *Neurobiol Dis*. 2019 Dec;132:104591. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104591
279. Uemura T, Goto T, Kang MS, Mizoguchi N, Hirai S, Lee JY, Nakano Y, Shono J, Hoshino S, Taketani K, Tsuge N, Narukami T, Makishima M, Takahashi N, Kawada T. Diosgenin, the main aglycon of fenugreek, inhibits LXR α activity in HepG2 cells and decreases plasma and hepatic triglycerides in obese diabetic mice. *J Nutr*. 2011 Jan;141(1):17-23. doi: 10.3945/jn.110.125591.
280. Uenoyama Y, Nagae M, Tsuchida H, Inoue N, Tsukamura H. Role of KNDy Neurons Expressing Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin A as a GnRH Pulse Generator Controlling Mammalian Reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Sep 9;12:724632. doi: 10.3389/fendo.2021.724632.
281. Veenendaal MV, Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, van der Post JA, Gluckman PD, Hanson MA, Roseboom TJ. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG*. 2013 Apr;120(5):548-53. doi: 10.1111/1471-0528.12136.
282. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*. 2005 Oct;146(10):4211-6. doi: 10.1210/en.2005-0581.
283. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod*. 2000 Feb;62(2):370-7. doi: 10.1095/biolreprod62.2.370.
284. Vitt UA, Hsueh AJ. Stage-dependent role of growth differentiation factor-9 in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Oct 25;183(1-2):171-7. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00614-1.
285. Vo KCT, Kawamura K. In Vitro Activation Early Follicles: From the Basic Science to the Clinical Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 6;22(7):3785. doi: 10.3390/ijms22073785.
286. Wang Q, Chi MM, Schedl T, Moley KH. An intercellular pathway for glucose transport into mouse oocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 15;302(12):E1511-8. doi: 10.1152/ajpendo.00016.2012.

287. Watkins AJ, Dias I, Tsuro H, Allen D, Emes RD, Moreton J, Wilson R, Ingram RJM, Sinclair KD. Paternal diet programs offspring health through sperm- and seminal plasma-specific pathways in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Oct 2;115(40):10064-10069. doi: 10.1073/pnas.1806333115.
288. Watkins AJ, Wilkins A, Cunningham C, Perry VH, Seet MJ, Osmond C, Eckert JJ, Torrens C, Cagampang FR, Cleal J, Gray WP, Hanson MA, Fleming TP. Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J Physiol*. 2008 Apr 15;586(8):2231-44. doi: 10.1113/jphysiol.2007.149229.
289. Wu LL, Dunning KR, Yang X, Russell DL, Lane M, Norman RJ, Robker RL. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology*. 2010 Nov;151(11):5438-45. doi: 10.1210/en.2010-0551.
290. Xhonneux I, Marei WFA, Meulders B, Andries S, Leroy JLMR. The impact of a maternal and offspring obesogenic diet on daughter's oocyte mitochondrial ultrastructure and bioenergetic responses. Insights from an outbred mouse model. *Front Physiol*. 2023 Oct 25;14:1288472. doi: 10.3389/fphys.2023.1288472.
291. Xhonneux I, Marei WFA, Meulders B, Slotmans J, Pintelon I, Leroy JLMR. The impact of offspring and maternal obesogenic diets on adult offspring oocyte mitochondrial morphology in primordial and preantral follicles. *PLoS One*. 2024 Jun 27;19(6):e0305912. doi: 10.1371/journal.pone.0305912.
292. Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1992 Sep;131(3):1009-16. doi: 10.1210/endo.131.3.1505447.
293. Yamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm Res*. 1992;37 Suppl 1:5-11. doi: 10.1159/000182335.
294. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*. 2001 Jun;15(6):854-66. doi: 10.1210/mend.15.6.0662.
295. Ying SY. Inhibins and activins: chemical properties and biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1987 Dec;186(3):253-64. doi: 10.3181/00379727-186-42611a.
296. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012 May;16(5):284-7. doi: 10.1089/omi.2011.0118.
297. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 4;94(3):1023-8. doi: 10.1073/pnas.94.3.1023.
298. Yung Y, Aviel-Ronen S, Maman E, Rubinstein N, Avivi C, Orvieto R, Hourvitz A. Localization of luteinizing hormone receptor protein in the human ovary. *Mol Hum Reprod*. 2014 Sep;20(9):844-9. doi: 10.1093/molehr/gau041.
299. Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol*. 2001 Jan;15(1):172-83. doi: 10.1210/mend.15.1.0582.
300. Zhang X, Wang W, Zhu W, Dong J, Cheng Y, Yin Z, Shen F. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *Int J Mol Sci*. 2019 Nov 8;20(22):5573. doi: 10.3390/ijms20225573.

301. Zhao J, Taverne MA, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod.* 2001 Sep;65(3):967-77. doi: 10.1095/biolreprod65.3.967.
302. Zhao S, Fernald RD. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol.* 2005 Oct;12(8):1047-64. doi: 10.1089/cmb.2005.12.1047.
303. Zheng J, Alves-Wagner AB, Stanford KI, Prince NB, So K, Mul JD, Dirice E, Hirshman MF, Kulkarni RN, Goodyear LJ. Maternal and paternal exercise regulate offspring metabolic health and beta cell phenotype. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2020 Feb;8(1):e000890. doi: 10.1136/bmjdr-2019-000890.
304. Zhou X, Mo Z, Li Y, Huang L, Yu S, Ge L, Hu Y, Shi S, Zhang L, Wang L, Gao L, Yang G, Chu G. Oleic acid reduces steroidogenesis by changing the lipid type stored in lipid droplets of ovarian granulosa cells. *J Anim Sci Biotechnol.* 2022 Feb 8;13(1):27. doi: 10.1186/s40104-021-00660-5.
305. Zhou Y, Xu Y. Nutrition and Metabolism in the First 1000 Days of Life. *Nutrients.* 2023 May 30;15(11):2554. doi: 10.3390/nu15112554.
306. Zhou Z, Lin Q, Xu X, Illahi GS, Dong C, Wu X. Maternal high-fat diet impairs follicular development of offspring through intraovarian kisspeptin/GPR54 system. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019 Jan 22;17(1):13. doi: 10.1186/s12958-019-0457-z.

8. Wykaz publikacji autorki rozprawy

- Liu WC, Wu CW, Tsai PC, Gutkowska-Kawka D, Fu MH, Tain YL, Hsu CN, Hung CY, Chen IC, Wu KLH, Kaczmarek MM. tert-Butylhydroquinone reversed age-dependent hypothalamic mitochondrial dysfunction linking maternal fructose exposure to synaptic vulnerability. *Mol Metab.* 2026 (w recenzji).
- Kulesza-Brończyk B, Bzikowska-Jura A, Bień A, Mołas A, Wesołowska A, Molcan T, Gutkowska-Kawka D, Kaczmarek MM. Analysis of human milk leptin and ghrelin in relation to maternal factors and infant weight gain during six months. *Pol J Food Nutr Sci.* 2026, vol. 76, no. 1.
- Grzęda E, Gutkowska-Kawka D, Matuszewska J, Kilańczyk E, Kaczmarek MM, Dylewski Ł, Sliwowska JH. Maternal cafeteria diet adversely affects the reproductive parameters of rat offspring in a sex-specific manner. *Reprod Biol Endocrinol.* 2025 May 26;23(1):79. doi: 10.1186/s12958-025-01412-0.
- Jana B, Całka J, Bulc M, Kawka D. The regulatory action of acetylcholine and its receptors on B4 and C4 leukotriene formation in the porcine endometrium after experimental inflammogenic *Escherichia coli* infection. *J Vet Res.* 2024 Nov 29;68(4):571-581. doi: 10.2478/jvetres-2024-0066.
- Mackiewicz J, Kawka D, Ostrowska K, Uniatowska P, Jagodzińska R, Plucińska K, Jerzemowska G. Rola jądra konarowo-mostowego w kontekście choroby Parkinsona i głębokiej stymulacji mózgu. W: Nyćkowiak J, Leśny J, redaktorzy. *Nauki medyczne i nauki o zdrowiu, cz. 7. Choroby.* Poznań: Młodzi Naukowcy; 2019. p. 62–68.
- Kletke O, Kawka D, Mackiewicz J, Jaskulski M, Plucińska K, Jerzemowska G. Podłoże neurofizjologiczne zmienności behawioralnej u szczurów w kontekście uzależnień. W: Nyćkowiak J, Leśny J, redaktorzy. *Nauki przyrodnicze, cz. 11.* Poznań: Młodzi Naukowcy; 2018. p. 41–46.