

## Streszczenie:

We wczesnym okresie rozwoju, obejmującym życie płodowe i czas po urodzeniu, organizm jest szczególnie wrażliwy na wpływy środowiskowe, zwłaszcza matczyne. Zarówno niedobór, jak i nadmiar składników odżywczych mogą w tym czasie kształtować rozwój potomstwa, a niekiedy także wywoływać skutki wielopokoleniowe. U myszy w okresie postnatalnym intensywnie dojrzewa oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG, ang. *hypothalamus-pituitary-gonadal axis*), współregulowana przez neurony kisspeptynowe w jądrze przednio-brzuszo-okołokomorowym/jądrze okołokomorowym (AVPV/PeN, ang. *anteroventral periventricular nucleus/periventricular nucleus*) oraz jądrze łukowatym (ARC, ang. *arcuate nucleus*). Ważną rolę w dojrzewaniu obwodów neuronalnych ARC odgrywa leptyna, będąca sygnałem stanu metabolicznego organizmu.

Celem pracy było zbadanie, jak przejściowe niedożywienie matek w okresie laktacji (ograniczona podaż energii, składników odżywczych i substancji bioaktywnych w mleku) wpływa na funkcjonowanie osi HPG u samic pokolenia F1 oraz czy skutki te są widoczne także w pokoleniu F2, które nie było bezpośrednio narażone na niedożywienie. Po porodzie samice F0 i ich mioty (F1) przydzielono do grup: CON (żywienie *ad libitum*) i LUN (50% dawki karmy grupy kontrolnej podczas laktacji). Pokolenie F2 uzyskano z kojarzeń CON x CON (CC), LUN x CON (LC) i LUN x LUN (LL) i wszystkie zwierzęta karmiono *ad libitum*.

U samic F1 oceniono fenotyp (masa i skład ciała, dojrzewanie płciowe, płodność, profil hormonalny, folikulogenezę), zmiany molekularne i metaboliczne (RNA-seq jajników, potencjał metaboliczny oocytów) oraz podwzgórzową regulację osi HPG (układ kisspeptynowy, sygnalizacja estradiolowa, neurony KNDy i neurony z receptorem leptyny w ARC). Analizowano też wzrost aksonów neuronów ARC w odpowiedzi na leptynę w okresie postnatalnego szczytu jej stężenia. Podobny zestaw analiz wykonano u F2.

Wykazano, że przejściowy stres żywieniowy skutkował u samic LUN długotrwale obniżoną masą ciała i zawartością tkanki tłuszczowej, czemu początkowo towarzyszyło niższe stężenie leptyny w osoczu. Stwierdzono także niższe stężenie androstendionu i wyższe LH niż w grupie CON. W jajnikach obserwowano mniej pęcherzyków drugorzędowych i antralnych, co wiązało się z obniżeniem potencjału rozrodczego wraz z wiekiem. Analizy molekularne wykazały przeprogramowanie metaboliczne jajników (geny związane z metabolizmem lipidów i steroidogenezą) oraz oocytów (większa zawartość lipidów, wyższy potencjał mitochondrialny, zmieniony status redoks). W podwzgórzu samic LUN stwierdzono obniżoną ekspresję *Kiss1* w AVPV/PeN, zwiększoną ekspresję *Lepr* w ARC i podwyższoną ekspresję ER $\alpha$  w AVPV/PeN w 21 dniu życia. Niedożywienie obniżało też ogólną wrażliwość neuronów ARC na leptynę, przy zachowanej odpowiedzi neuronów kisspeptynowych.

W pokoleniu F2 najsilniejsze zmiany dotyczyły grupy LL: w 21 dniu życia miały niższą masę ciała i mniej tkanki tłuszczowej oraz wyższe stężenie estradiolu, a także później doszło u nich do otwarcia dróg rodnych niż u CC. Choć w dorosłości różnice fenotypowe w dużej mierze zanikały, utrzymywały się wybrane zmiany metaboliczne oocytów (lipidy, potencjał mitochondrialny, redoks) i część zmian ekspresji genów jajnika, podobnych do obserwowanych w F1.

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, 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 w krytycznym oknie programowania rozwojowego potomstwa oraz wyznacza nowe kierunki badań nad mechanizmami wielopokoleniowego programowania żywieniowego płodności samic.

## Abstract:

During early development, including fetal life and the early postnatal period, the organism is highly sensitive to environmental influences, particularly maternal ones. Both nutrient deficiency and excess can shape offspring development and may even have multigenerational effects. In mice, the hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis undergoes intensive maturation during the postnatal period and is co-regulated by kisspeptin neurons located in the anteroventral periventricular/periventricular nucleus (AVPV/PeN) and the arcuate nucleus (ARC). Leptin, a key signal of the body's metabolic status, plays an important role in the maturation of ARC neuronal circuits.

The aim of this study was to investigate how transient maternal undernutrition during lactation (reduced supply of energy, nutrients, and bioactive compounds in milk) affects HPG axis function in F1 females, and whether these effects are also present in the F2 generation, which was not directly exposed to undernutrition. After parturition, F0 dams and their litters (F1) were assigned to the following groups: CON (fed *ad libitum*) and LUN (receiving 50% of the food intake of the control group during lactation). The F2 generation was obtained from CON × CON (CC), LUN × CON (LC), and LUN × LUN (LL) matings, and fed *ad libitum*.

In F1 females, phenotype was assessed (body weight and composition, pubertal development, fertility, hormonal profile, and folliculogenesis), molecular and metabolic changes (ovarian RNA-seq, oocyte metabolic potential), and hypothalamic regulation of the HPG axis (the kisspeptin system, estradiol signaling, KNDy neurons, and leptin receptor-expressing neurons in the ARC). We also analyzed ARC axon growth in response to leptin during the postnatal peak of circulating leptin. A similar set of analyses was performed in F2 females.

Transient nutritional stress caused persistent reductions in body weight and adiposity in LUN females, initially with lower plasma leptin. Compared with CON, LUN females also showed lower androstenedione and higher LH levels. Additionally, they had fewer secondary and antral follicles, consistent with an age-related decline in reproductive potential. Molecular analyses revealed metabolic reprogramming of the ovaries (changes in genes related to lipid metabolism and steroidogenesis) and oocytes (increased lipid content, higher mitochondrial potential, and altered redox status). In the hypothalamus of LUN females, reduced *Kiss1* expression in the AVPV/PeN, increased *Lepr* expression in the ARC, and elevated ER $\alpha$  expression in the AVPV/PeN were found on postnatal day 21. Undernutrition also decreased the overall sensitivity of ARC neurons to leptin stimulation, while preserving the response of kisspeptin neurons.

In the F2 generation, the strongest effects were observed in the LL group: on postnatal day 21, these females had lower body weight, reduced adiposity, and higher estradiol levels, and they exhibited delayed vaginal opening compared with the CC group. Although phenotypic differences largely disappeared in adulthood, selected metabolic alterations in oocytes (lipids, mitochondrial potential, redox status) and some ovarian gene expression changes persisted, similar to those observed in F1.

In summary, maternal undernutrition during lactation induces extensive and long-lasting alterations in the reproductive axis of female offspring—from hypothalamic-hormonal regulation, through ovarian function, to the metabolism of individual oocytes. Some of these changes persist in the F2 generation, indicating multigenerational transmission of its effects. Reprogramming of oocyte lipid and energy metabolism may play a key role in mediating the transmission of nutritional stress effects to subsequent generations. This study provides the first comprehensive analysis of undernutrition during a critical developmental window and highlights new directions for research on multigenerational nutritional programming of female fertility.