

VII. STRESZCZENIE

Praca doktorska lek. wet. mgr Barbary Socha pt. „Ekspresja PPAR w endometrium podczas eksperymentalnie indukowanych stanów zapalnych błony śluzowej macicy krowy”

Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (PPAR) należą do rodziny receptorów jądrowych. Wyróżnia się trzy izoformy: PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ . Aktywność PPAR może być modyfikowana przez szereg endogennych związków, w tym przez kwas arachidonowy (AA) i jego metabolity oraz syntetyczne ligandy. Liczne badania wykazały, że PPAR są zaangażowane w regulację procesów rozrodczych na osi podwzgórze-przysadka-gonady.

Z kolei *endometritis* jest częstym schorzeniem u krów mlecznych. Głównym czynnikiem zakaźnym jest *Escherichia coli*. Lipopolisacharyd (LPS) jako charakterystyczny składnik ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, stymuluje komórki wrodzonego układu odpornościowego przy udziale receptorów z rodziny receptorów Toll-podobnych. W związku z powyższym założono, że ekspresja PPAR na poziomie genu i białka różni się w *endometrium*

krowy w wybranych dniach cyklu rujowego. Ponadto, profil ekspresji PPAR może zmieniać się w *endometrium* krowy pod wpływem LPS lub *E. coli*.

Celem badań było określenie: 1) immunolokalizacji, ekspresji mRNA i białka PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ w *endometrium* krowy w przebiegu cyklu rujowego. Wycinki *endometrium* uzyskano *post mortem* od jałówek w dniach 0 (faza estrus, n=6), 2-5 (faza wczesno-lutealna, n=6), 8-12 (faza środkowo-lutealna, n=6), 15-17 (faza późno-lutealna, n=6) i 19-21 (faza pęcherzykowa, n=6) cyklu rujowego. Wyniki analizowano statystycznie za pomocą jednoczynnikowej ANOVA z post-testem porównawczym *Bonferroniego*; 2) ekspresji mRNA i białka PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ w skrawkach *endometrium* krowy podczas eksperymentalnie indukowanego *endometritis*. Skrawki *endometrium* pozyskano pośmiertnie od jałówek (n=8), a następnie inkubowano bez (grupa kontrolna) lub z dodatkiem LPS (1 μ g/ml) przez 12, 24, 48, 72 i 96 godz. Różnice między grupami badano przy użyciu testu t-Studenta; 3) ekspresji mRNA i białka PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ w *endometrium* krowy podczas eksperymentalnie indukowanego *endometritis* - *in vivo*. Jałówkom podawano zawiesinę *E. coli* w 0,9% NaCl (n = 8) lub 0,9% NaCl (grupa kontrolna, n=6) we wlewie domacicznym. Biopsje *endometrium* przeprowadzono przed (godz. 0) i 12, 24, 48, 72, 96 godz. po wlewie. Z żyły ogonowej pobierano krew. Wyniki analizowano statystycznie stosując dwuczynnikową ANOVA z post-testem porównawczym *Bonferroniego*.

Immunolokalizację PPAR określono w *endometrium* przy użyciu immunohistochemii. Ekspresję mRNA i białka oceniono odpowiednio metodą Real-Time PCR i Western blotting. Stężenie metabolitów AA w medium hodowlanym oraz w osoczu oznaczono stosując test ELISA. Skuteczność eksperymentalnie indukowanego *endometritis* zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* potwierdzono w skrawkach lub biopsjach *endometrium* ekspresją na poziomie mRNA wybranych mediatorów zapalnych: kompleksu receptora TLR4-MD2-CD14 oraz *IL-1 β* , *I-L6* i *TNF α* , a także określając stężenie prostaglandyn (PGE₂, PGF_{2 α} /PGFM) i leukotrienów (LTB₄, LTC₄) w medium hodowlanym lub osoczu krwi.

Badania wstępne wykazały, że ekspresja mRNA i białka PPAR γ zmieniała się w tkance w badanych dniach cyklu rujowego, podczas gdy poziomy transkryptomu i proteomu PPAR α

i PPAR β/δ nie wykazywały różnic w cyklu. Najwyższą ekspresję mRNA i białka PPAR γ stwierdzono w fazie *estrus*, a najniższą w fazie środkowo-lutealnej. W badaniach *in vitro* ekspresja PPAR α na poziomie białka wzrastała po 48 godz. stymulacji LPS, natomiast po 12, 24, 72 i 96 godz. była obniżona. Z kolei ekspresja PPAR β/δ na poziomie białka wzrastała po 24, 72 i 96 godz., ale po 12 i 48 godz. stymulacji LPS obniżała się. Ekspresja PPAR γ_1 na poziomie białka była wyższa po 12, 24 i 96 godz. stymulacji LPS zarówno dla PPAR γ_1 , jak i dla PPAR γ_2 . W badaniach *in vivo* ekspresja PPAR α na poziomie białka wzrastała po 48 i 72 godz. od domacicznego wlewu *E. coli*, podczas gdy po 12, 24 i 96 godz. Obniżała się. Ekspresja PPAR β/δ na poziomie białka była niska po 24 godz., ale po 72 i 96 godz. od wlewu domacicznego *E. coli* wzrastała, ekspresja PPAR γ_1 była obniżona po 48 godz., a PPAR γ_2 po 72 godz., podczas gdy ekspresja białka dla PPAR γ_1 była podwyższona po 96 godz., a dla PPAR γ_2 po 12 godz., od wlewu domacicznego *E. coli*.

Wyniki wskazują na obecność PPAR α , PPAR β/δ i PPAR γ w *endometrium* krowy, jednak fluktuacje ekspresji mRNA i białka w przebiegu cyklu rujowego wykazano tylko dla PPAR γ , zwłaszcza w fazach *estrus* i środkowo-lutealnej. Co więcej, wykazano zmiany profilu ekspresji mRNA i białka izoform PPAR w *endometrium* pod wpływem LPS. Ponadto stwierdzono, że *E. coli* wpływa na profil ekspresji PPAR w *endometrium* krowy w zależności od czasu trwania eksperymentalnie indukowanego *endometritis*.

Uzyskane wyniki wskazują na korelację pomiędzy ekspresją PPAR a hormonami steroidowymi w *endometrium* krowy w przebiegu cyklu rujowego. Ponadto, profil ekspresji PPAR zmienia się podczas procesów zapalnych występujących w odpowiedzi na działanie LPS w *endometrium* krowy.