

Załączniki:

Streszczenie pracy doktorskiej z akceptacją promotora.

Poowulacyjne wzgórki jajonośne produkują progesteron, jednak mechanizm tego procesu nie jest znany. U szczura poowulacyjne COC wykazują zarówno ekspresję 3β -HSD, enzymu odpowiedzialnego za produkcję progesteronu, a także ekspresję AR i cytochromu P450c17. Ekspresja AR świadczy o tym, że poowulacyjny COC jest strukturą docelową dla androgenów, a obecność cytochromu P450c17 o możliwości syntetyzowania tych steroidów. Jednoczesna ekspresja AR i cytochromu P450 sugeruje auto- i parakrynną regulację funkcji COC przez androgeny.

Założeniem prezentowanej pracy było określenie roli androgenów w regulacji funkcji poowulacyjnych wzgórek jajonośnych szczura. Doświadczenia przeprowadzono z uwzględnieniem różnic między wzgórkami jajonośnymi zawierającymi niezapłodnione (ufCOC) i zapłodnione (fCOC) oocyty. Badania zostały podzielone na część *in vivo* i *in vitro*. Wykonano także badania na obecność białka akwaporyny 5 (AQP5) w pęcherzykach jajnikowych i w poowulacyjnych COC. Białko to wybrano ponieważ jego ekspresja jest najprawdopodobniej androgenozależna, a uwodnienie wzgórka jajonośnego i bańki jajowodu w czasie okołowulacyjnym jest istotne z punktu widzenia prawidłowego zapłodnienia. W eksperymentach *in vivo* analizowano zawartość steroidów w homogenatach świeżo izolowanych poowulacyjnych ufCOC i fCOC. Otrzymane rezultaty wykazały różnice w steroidowej funkcji i steroidowym milieu między badanymi strukturami. Bańki jajowodu z ufCOC zawierały znacząco więcej P4 niż z fCOC, a izolowane ufCOC również wykazywały tendencję do posiadania większych ilości P4 niż fCOC. Analiza ekspresji białka AR i izoform receptora prolaktyny (PRL-R) metodą Western-blot, przeprowadzona w świeżo izolowanych wzgórkach wykazała różnice w ekspresji badanych białek: ufCOC wykazywały znacznie wyższą ekspresję AR i obu izoform (długiej i krótkiej) PRL-R niż fCOC.

Celem badań *in vitro* było ustalenie wpływu testosteronu (T) na produkcję steroidów przez ufCOC i fCOC. Ponieważ w części *in vivo* wykazano różnice w ekspresji PRL-R, do badań włączono również prolaktynę (PRL). Poowulacyjne wzgórki obu typów inkubowano przez 4,5 godz. w kontrolnym medium Eagle'a (K) lub w mediach z dodatkiem: testosteronu (T), antyandrogenu 2-hydroksyflutamidu (2-Hf), który blokował receptorowe działanie androgenów, 2-hydroksyflutamidu i testosteron (2-Hf+T), prolaktyny (PRL) i prolaktyny łącznie z testosteronem (PRL+T).

Inkubowane wzgórki uwalniały tylko progesteron. Profile P4 były zwykle wyższe w inkubowanych ufCOC. Testosteron zwiększył zawartość P4 tylko w inkubowanych fCOC, podczas gdy 2-Hf znacznie obniżył poziom P4 zarówno w ufCOC jak i fCOC. Kompleks hormonalny PRL+T stymulował sekrecję P4 w poowulacyjnych wzgórkach, ale w znacząco większym stopniu w ufCOC niż w fCOC. Również sumaryczna wartość (sekrecja plus zawartość w homogenatach) poinkubacyjnego P4 w obecności tego kompleksu była znacząco wyższa dla ufCOC niż dla fCOC.

Ekspresję białka 3β -HSD metodą Western-blot stwierdzono we wszystkich badanych poinkubacyjnych wzgórkach jajonośnych. Najwyższy poziom tego białka obserwowano po inkubacji w pożywce suplementowanej PRL+T ufCOC, a najniższą w fCOC po inkubacjach z dodatkiem 2-Hf i 2-Hf+T.

Poinkubacyjne wzgórki wykazały pozytywną immunohistochemiczną reakcję na 3β -HSD, P450c17 i AR. Różnice w intensywności zabarwienia zaobserwowano tylko w przypadku 3β -HSD, dla której pozytywna reakcja na obwodach wzgórek jajonośnych i w oderwanych od wzgórek komórkach ziarnistych była dużo intensywniejsza.

Analiza morfologiczna poinkubacyjnych wzgórek jajonośnych wykazała pozytywne działanie T, PRL i kompleksu PRL+T, natomiast szkodliwe działanie 2-Hf i 2-Hf+T na

konformację badanych struktur. Obecność 2-Hf i 2-Hf+T w pożywce inkubacyjnej ufCOC skutkowało również brakiem lub zdegenerowanym pierwszym ciałkiem kierunkowym i obecnością rozproszonych w oocycie chromosomów, ale nie wpływała niekorzystnie na przedjądrza, obecne w oocytach fCOC.

Część poinkubacyjnych ufCOC poddano procedurze IVF. Najwyższy procent zapłodnionych oocytów uzyskano po wcześniejszej inkubacji w PRL+T. Natomiast ufCOC inkubowane z 2-Hf lub 2-Hf+T były niezapłodnialne.

W badaniach nad ekspresją AQP5 w czasie follikulogenezy wykazano jej obecność w pęcherzykach jajnikowych od stadium wczesnoantralnego do poowulacyjnego COC. AQP5 pierwszy raz pojawiła się w pęcherzykach przedantralnych, najprawdopodobniej w wypustkach komórek *corona radiata* i tworzyła charakterystycznego pierścień wokół oocytu. Ta pozytywna reakcja zaniknęła wraz z postępującym rozproszeniem wzgórka jajonośnego. Obecność AQP5 stwierdzono także w komórkach ziarnistych wzgórka w czasie ich ekspansji i po owulacji w bańce jajowodu, a także w produkowanej przez nie macierzy. Również poowulacyjne oocyty i komórki nabłonka bańki jajowodu wykazywały pozytywne barwienie na AQP5.

Wyniki badań potwierdziły receptorowe działanie androgenów na wzgórek jajonośny. W ufCOC T działał razem z PRL, a rezultatem tego działania mogło być dostarczenie większej ilości P4 do mikrośrodowiska oczekujących na zapłodnienie oocytów. Kompleks ten można wykorzystać w zapłodnieniu *in vitro* gatunków, których COC posiadają AR i PRL-R. Szkodliwe działanie 2-Hf i 2Hf+T na mejozę i zapłodnialność powinno być wzięte pod uwagę w badaniach COC z zastosowaniem antyandrogenów.

AQP5 pojawiła się w komórkach, które wykazują również ekspresję AR. Jej umiejscowienie może świadczyć o transcelularnym transporcie wody do oocytu w czasie rozwoju pęcherzyka, a w czasie ekspansji i po owulacji o transcelularnym uwodnieniu ECM, obu procesach prawdopodobnie regulowanych przez androgeny.

Marie Lohy >