Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii
im. Generała Karola Kaczkowskiego

Mechanizmy regulacji biosyntezy GnRH i receptora GnRH oraz sekrecji LH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych; wpływ czynników stresogennych.

AUTOREFERAT

dr Magdalena Olga Ciechanowska
Zakład Farmakologii i Toksykologii

1. **Imię i nazwisko:** Magdalena Olga Ciechanowska

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej**

Magister biologii, w zakresie fizjologii zwierząt, 1999, pracę magisterską pt. „*Czynniki modyfikujące reakcję odpornościową kurcząt*" wykonano pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Skwarło-Sońta w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Kręgowych Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Doktor nauk rolniczych w zakresie zootechniki, 2010, pracę doktorską pt. „*Ekspresja genów GnRH i receptora GnRH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych; wpływ czynników stresogennych*" wykonano pod kierunkiem prof. dr hab. Franciszka Przekopa w Zakładzie Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonnie.

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

Asystent w Zakładzie Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonnie, od 2001 do 2009.

Starszy specjalista badawczo-techniczny w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. gen. Karola Kaczkowskiego w Warszawie, od 2011 do 2013.

Adiunkt, kierownik Pracowni Toksykologii w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. gen. Karola Kaczkowskiego w Warszawie, od 2013 do chwili obecnej.

4. **Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):**

4. a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Mechanizmy regulacji biosyntezy GnRH i receptora GnRH oraz sekrecji LH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych; wpływ czynników stresogennych.

4. b. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

1. **Ciechanowska M**, Łapot M, Mateusiak K, Paruszewska E, Malewski T, Krawczyńska A, et al. The central effect of β-endorphin and naloxone on the biosynthesis of GnRH and GnRH receptor (GnRHR) in the hypothalamic-pituitary unit of follicular-phase ewes. Reprod Domest Anim. 2016; 51(4): 555-561. **IF – 1,400, MNiSW – 25**

Mój udział w wyżej wymienionej pracy obejmował sformułowanie koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń na zwierzętach, wykonanie oznaczeń przy użyciu testu ELISA, analizę i interpretację uzyskanych wyników, a także napisanie i przygotowanie publikacji do druku.
Mój udział procentowy szacuję na 70%.

2. **Ciechanowska M**, Łapot M, Antkowiak B, Mateusiak K, Paruszewska E, Malewski T, et.al. Effect of short-term and prolonged stress on the biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor (GnRHR) in the hypothalamus and GnRHR in the pituitary of ewes during various physiological states. Anim Reprod Sci. 2016; 174: 65-72. **IF – 1,605, MNiSW – 30**

   Mój udział w wyżej wymienionej pracy obejmował sformułowanie koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń na zwierzętach, wykonanie oznaczeń przy użyciu testu ELISA, analizę i interpretację uzyskanych wyników, a także napisanie i przygotowanie publikacji do druku.
   Mój udział procentowy szacuję na 75%.

3. **Ciechanowska M**, Łapot M, Mateusiak K, Paruszewska E, Malewski T, Przekop F. Biosynthesis of gonatropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor (GnRHR) in hypothalamic-pituitary unit of anoestrous and cyclic ewes. Can J Physiol Pharmacol. 2017; 95(2): 178-184. **IF – 2,210, MNiSW – 20**

   Mój udział w wyżej wymienionej pracy obejmował sformułowanie koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń na zwierzętach, wykonanie oznaczeń przy użyciu testu ELISA, analizę i interpretację uzyskanych wyników, a także napisanie i przygotowanie publikacji do druku.
   Mój udział procentowy szacuję na 75%.

4. **Ciechanowska M,** Łapot M, Paruszewska E, Radawiec W, Przekop F. The influence of domaminergic system inhibition on biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in anoestrous sheep; hierarchical role of kisspeptin and RFamide-related peptide-3 (RFRP-3). Reprod Fertil Dev. 2017; 30(4): 672-680. **IF – 2,105, MNiSW – 25**

   Mój udział w wyżej wymienionej pracy obejmował sformułowanie koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń na zwierzętach, wykonanie oznaczeń przy użyciu testu ELISA i metody Real-Time PCR, analizę i interpretację uzyskanych wyników, a także napisanie i przygotowanie publikacji do druku.
   Mój udział procentowy szacuję na 75%.

5. **Ciechanowska M,** Kowalczyk M, Łapot M, Malewski T, Antkowiak B, Brytan M, et al. Effect of corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone antagonist on biosynthesis of gonadotropin releasing hormone and gonadotropin releasing hormone receptor in the hypothalamic-pituitary unit of follicular-phase ewes and contribution of kisspeptin. J Physiol Pharmacol. 2018; 69(3): 451-461. **IF – 2,478, MNiSW – 25**

   Mój udział w wyżej wymienionej pracy obejmował sformułowanie koncepcji badań, zaplanowanie i wykonanie doświadczeń na zwierzętach, wykonanie oznaczeń przy

użyciu testu ELISA i metody Real-Time PCR, analizę i interpretację uzyskanych wyników, a także napisanie i przygotowanie publikacji do druku.
Mój udział procentowy szacuję na 65%.

Podstawowe informacje bibliometryczne o publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe:

Łączny Impact Factor prac wchodzących w zakres osiągnięcia - **9,798.**
Łączne punkty MNiSW prac wchodzących w zakres osiągnięcia - **125,**
w tym jako **autor pierwszy i korespondencyjny IF - 9,798 oraz MNiSW - 125.**
Indeks Hirsh'a: 8

4. c. omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Procesy rozrodcze samic ssaków są regulowane, przede wszystkim przez wpływ gonadoliberyny podwzgórzowej (GnRH) na komórki gonadotropowe w przysadce, w których neurohormon ten moduluje ekspresję genów kodujących podjednostki gonadotropin oraz sekrecję tych hormonów. Gonadotropiny, z kolei, wpływają na gonady stymulując w nich steroido- i oogenezę. Steroidy płciowe, poprzez oddziaływania zwrotnie skierowane, regulują natomiast sekrecję gonadotropin. Zatem kluczowym ogniwem w neuroendokrynnej regulacji rozrodu, a więc głównym czynnikiem kontrolującym kaskadę hormonów układu rozrodczego, jest niewielka populacja komórek GnRH w podwzgórzu, która jest miejscem opracowywania informacji ze środowiska zewnętrznego i wnętrza organizmu przed wysłaniem zintegrowanych sygnałów na obwód. Neurosekrecyjny układ GnRH przetwarza bowiem neurochemiczną informację pochodzącą z ośrodkowego układu nerwowego na aktywność wydzielniczą komórek gonadotropowych przedniego płata przysadki mózgowej. Gonadoliberyna aktywuje czynność sekrecyjną gonadotropów po uprzednim związaniu się ze specyficznym receptorem GnRH typu I (GnRHR, 328-aminokwasowy receptor związany z białkiem G), a każdy puls GnRH w specyficzny sposób pobudza biosyntezę i uwalnianie hormonu luteinizującego (LH) i folikulotropowego (FSH).

Ciała komórek GnRH w mózgu owcy nie tworzą skupisk, lecz są rozproszone, poczynając od przegrody mózgu, przez obszar pola przedwzrokowego, przedniego podwzgórza, aż po brzuszno-przyśrodkowe podwzgórze. Zdecydowana większość perykarionów GnRH znajduje się w okolicy przedwzrokowej, w obszarze przekątnej wstęgi Brocka, narządu naczyniowego blaszki krańcowej i zachyłka nadwzrokowego. Obecność jedynie nielicznych perykarionów GnRH wykazano w podwzgórzu brzuszno-przyśrodkowym

(Caldani i wsp., 1988). Aksonalne projekcje tych komórek, uczestniczące w regulacji czynności gonadotropowej przysadki, podążają do wyniosłości pośrodkowej podwzgórza. GnRH uwalniany jest w sposób pulsacyjny z zakończeń nerwowych usytuowanych w tej strukturze, a parametry pulsacyjnej sekrecji tego neurohormonu (amplituda i częstotliwość) są funkcją stanu hormonalnego organizmu. Aktywność sekrecyjna układu GnRH zmienia się bowiem u owcy w poszczególnych stanach fizjologicznych. Długość okresu aktywności płciowej (okres estralny) oraz długość okresu zahamowania tej aktywności (okres anestralny) mogą różnić się istotnie w zależności od rasy, ale zawsze cykl ten gwarantuje samicy synchronizację sezonu rozrodczego z czasem najdogodniejszym dla wydania i przeżycia potomstwa.

U samic gatunków o sezonowym charakterze rozrodu, do których należy owca, uwalnianie GnRH w wyniosłości pośrodkowej znajduje się pod ścisłą kontrolą hormonów steroidowych wytwarzanych przez jajniki. Precyzując, pobudzanie bądź hamowanie pulsacyjnego uwalniania GnRH przez estradiol zależy od poziomu tego estrogenu oraz progesteronu w krwi obwodowej oraz od czasu oddziaływania tych hormonów na komórki docelowe. Część tej estrogenowej kontroli pełniona jest na poziomie podwzgórza (Karsch i wsp., 1987), poprzez wpływ steroidów płciowych na poziom uwalnianego GnRH, część natomiast na poziomie przysadki (Nett, 1990) i w głównej mierze dotyczy wpływu tych hormonów na ekspresję genu *GnRHR* w komórkach gonadotropowych przedniego płata tego gruczołu. Mechanizmy ekspresji GnRHR w przysadce wydają się być bardzo istotne dla regulacji czynności całego układu podwzgórze-przysadka-gonady (HPG). Wykazano, że prawidłowa stymulacja aktywności sekrecyjnej komórek gonadotropowych przysadki przez GnRH wymaga trwałego utrzymania określonego poziomu receptora w błonie oraz mRNA GnRHR w cytoplazmie tych komórek. Poziom aktywnych form GnRHR w komórkach gonadotropowych determinuje bowiem zdolność odpowiedzi tych komórek na GnRH (Rispoli i Nett, 2005).

Dokładny mechanizm wpływu estradiolu na aktywność sekrecyjną układu GnRH nie został dotychczas sprecyzowany. Dane z piśmiennictwa wskazują, że ten wpływ jest wywierany raczej pośrednio, poprzez ośrodkowy aferentny układ neuronalny (Herbison, 1998; Dobson i wsp., 2003, Ciechanowska i wsp., 2010). Brak jest zdecydowanych dowodów na bezpośrednią regulację neuronów GnRH przez estradiol. Zważywszy dodatkowo na fakt, że ogromna większość komórek GnRH w podwzgórzu u owcy (Herbison, 1998), podobnie zresztą jak u innych ssaków (Shivers i wsp., 1983), nie wykazuje ekspresji receptorów

estrogenowych, oczywistym wydaje się, że aferentny dopływ sygnałów do neuronów GnRH jest niezbędny do regulacji sekrecji tego neurohormonu przez estradiol. Ponadto obecność w układzie GnRH receptorów dla licznych neuroprzekaźników i neuropeptydów regulacyjnych oraz istnienie połączeń synaptycznych neuronów GnRH z komórkami innych podwzgórzowych układów neuronalnych, wspierają możliwość kontroli aktywności sekrecyjnej układu GnRH przez różne szlaki neuronalne podwzgórza. Dane z piśmiennictwa dowodzą, że regulacja sekrecji GnRH u owcy jest ściśle powiązana z aktywnością układów klasycznych neuroprzekaźników i neuromodulatorów, takich jak: noradrenalina, β-endorfina, kwas gamma-aminomasłowy (GABA), hormon uwalniający kortykotropinę (CRH) czy dopamina (Ciechanowska i wsp., 2010). Poważnymi kandydatami do pośredniczenia w estrogenowej kontroli aktywności sekrecyjnej układu GnRH są także nowo poznane neuropeptydy z rodziny RFamidowej - kisspeptyna (Kiss 1) i RFamide-related peptide 3 (RFRP3), (Smith i wsp., 2008). Chociaż natura tej zależnej od estrogenów regulacji jest dwojaka, to znaczy dotyczy pobudzania lub hamowania wydzielania GnRH, to w świetle dostępnych wyników badań podział układów neuronalnych, na te o charakterze stymulującym lub hamującym sekrecję GnRH, jest w wielu przypadkach nieścisły. Należy bowiem podkreślić, że funkcje wielu neuroprzekaźników i neuropeptydów uczestniczących w regulacji uwalniania GnRH ulegają zmianom w poszczególnych stanach fizjologicznych.

Fizjologiczne współzależności, charakterystyczne dla różnych okresów cyklu rozrodczego, mogą podlegać poważnym zaburzeniom u zwierząt w warunkach stresogennych. Liczne doniesienia wskazują, że zarówno stres chroniczny, jak i o przedłużonym działaniu hamuje sekrecję gonadotropin i procesy owulacji (Ciechanowska i wsp., 2007; Pierce i wsp., 2008), lecz wczesna odpowiedź organizmu na czynniki stresogenne może przejawiać się wzrostem aktywności sekrecyjnej układu GnRH/LH (Łapot i wsp., 2007). Powszechnie wiadomo, że reakcja stresowa uruchamia wiele szlaków fizjologicznych, a działanie różnych stresorów przejawia się przede wszystkim aktywacją układu podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) i wzrostem poziomu glikokortykoidów we krwi. Należy jednak zaznaczyć, że wpływ stresu na czynność sekrecyjną układu GnRH/LH zależy od wielu czynników, a między innymi od wieku i płci zwierzęcia, stanu fizjologicznego, rodzaju działającego stresora, jego intensywności i czasu działania.

Chociaż neuroendokrynne mechanizmy uwalniania GnRH i jego funkcja związana z regulacją czynności gonadotropowej przysadki w różnych stanach fizjologicznych są już dość dobrze poznane, to molekularne procesy, które regulują sekrecję tego neurohormonu

pozostają wciąż w sferze naukowych poszukiwań. Nieznana jest również rola szerszego (poza komórkami gonadotropowymi) występowania GnRHR, choć dane z piśmiennictwa sugerują, że mRNA GnRHR w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu u szczura może uczestniczyć w kontroli uwalniania GnRH (Seong i wsp., 1998). Podstawą takiego przypuszczenia są informacje wskazujące, że aktywacja GnRHR w tym obszarze podwzgórza wywiera hamujący wpływ na uwalnianie neurohormonu (DePaolo i wsp. 1987). Badania przeprowadzone na szczurach pozwoliły również na wysunięcie hipotezy, w myśl której te podwzgórzowe neurotransmitery i neuromodulatory, które pośredniczą w estrogenowej kontroli uwalniania GnRH/LH, uczestniczą także w regulacji ekspresji genów *GnRH* (Kang i wsp., 1995) i *GnRHR* (Seong i wsp., 1995). Wsparciem dla takiej koncepcji jest poprzedni cykl prac mojego zespołu (Ciechanowska i wsp., 2010), chociaż wczesne badania w modelu owcy (Harris i wsp., 1998) wskazywały, że neuroendokrynne mechanizmy kontrolujące uwalnianie GnRH są odmienne od tych, które regulują ekspresję genu tego neurohormonu. Jednakże, odnotowany wielokrotnie w badaniach własnych, podobny kierunek zmian ekspresji mRNA GnRH w podwzgórzu i mRNA GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej oraz stężeń LH w osoczu krwi (Ciechanowska i wsp., 2010) wyraźnie sugerował, że regulacja uwalniania GnRH/LH u owcy może zachodzić na poziomie molekularnym. Aby ostatecznie potwierdzić to przypuszczenie, należało podjąć badania, których istotą było ustalenie współzależności pomiędzy poziomami transkrypcji i translacji genów *GnRH* i *GnRHR*, zwłaszcza że relacja między tymi procesami może być daleka od prostej i liniowej zależności (Maier i wsp., 2009).

W świetle tych, przedstawionych w ogromnym skrócie, informacji wydawało się, że dokładna analiza procesów potranskrypcyjnych, pozwalająca lepiej zrozumieć mechanizmy kontrolujące uwalnianie GnRH z podwzgórza i sekrecję LH z przedniego płata przysadki mózgowej, powinna być przedmiotem kolejnych dociekań naukowych, zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów fizjologicznej regulacji procesów rozrodczych oraz do sprecyzowania podłoża ich patologii. Podjęcie takich badań wydawało się wysoce zasadne, tym bardziej, że dysfunkcja na poziomie ekspresji genów w obrębie układu podwzgórzowo-przysadkowego może prowadzić do licznych zaburzeń funkcji rozrodczej organizmu, w skrajnych zaś przypadkach do niepłodności czy bezpłodności - poważnych schorzeń, stwarzających istotne problemy zarówno medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Takie podejście merytoryczne stało się inspiracją do próby pozyskania środków finansowych na kontynuację moich zainteresowań naukowych. W 2012 roku, to jest rok po zakończeniu

prac mego zespołu związanych z realizacją poprzedniego celu badawczego (Ciechanowska i wsp. 2011), opracowany przeze mnie projekt pt. „Biosynteza GnRH i receptora GnRH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych" otrzymał finansowanie z funduszy Narodowego Centrum Nauki na lata 2013-2016. Zaproponowane do realizacji w ramach projektu zadania stanowiły oryginalne prace badawcze, których wymiernym efektem jest seria publikacji przedstawiona w ramach osiągnięcia habilitacyjnego. Badania opisane w cyklu publikacji są kontynuacją wieloletnich prac Zespołu Zakładu Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonnie, poświęconych pierwotnie neuroendokrynnym mechanizmom regulacji uwalniania GnRH/LH u owcy w różnych stanach fizjologicznych i następnie badań z moim, nie małym, udziałem nad molekularnymi mechanizmami regulującymi uwalnianie tych hormonów.

Głównym celem przedstawionych badań było poznanie ośrodkowych neuronalnych mechanizmów kontrolujących uwalnianie GnRH/LH na poziomie biosyntezy GnRH i GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych, także w warunkach stresogennych

Szczegółowe cele pracy to udzielenie odpowiedzi na pytania:

• Jakie współzależności zachodzą pomiędzy poziomami biosyntezy GnRH i GnRHR w okolicy przedwzrokowej-podwzgórzu oraz GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej, a uwalnianiem LH u owiec w różnych stanach fizjologicznych - w okresie anestralnym oraz w poszczególnych fazach cyklu estralnego?

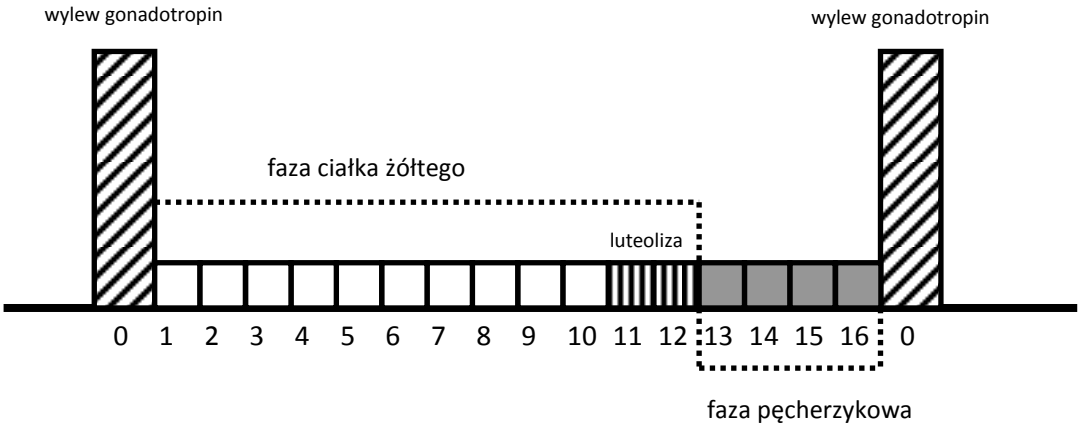
• Czy farmakologiczne zablokowanie aktywności sekrecyjnej neuronów dopaminy w podwzgórzu anestralnych owiec może pobudzać uwalnianie GnRH/LH na poziomie biosyntezy GnRH i GnRHR w wybranych obszarach układu przedwzrokowo-podwzgórzowo-przysadkowego i angażować nowo poznane peptydy, Kiss 1 i RFRP3?

• W jaki sposób aktywacja farmakologiczna oraz zablokowanie receptorów opioidowych typu μ wpływają na poziomy GnRH i GnRHR w okolicy przedwzrokowej-podwzgórzu i GnRHR w przysadce oraz na stężenie LH w osoczu krwi samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego?

• Czy istnieją różnice we wpływie stresu fizycznego, krótkotrwałego i o przedłużonym działaniu, na poziomy biosyntezy GnRH i GnRHR w wybranych obszarach układu przedwzrokowo-podwzgórzowego oraz GnRHR w przysadce, a także na stężenie LH w osoczu krwi anestralnych owiec i samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego?

• Jakie mechanizmy pośredniczą we wpływie CRH oraz antagonisty CRH (CRH-A) na poziomy potranslacyjnych produktów genów kodujących *GnRH* i *GnRHR* w okolicy przedwzrokowej-podwzgórzu i *GnRHR* w przysadce oraz na stężenie LH w osoczu krwi owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego?

Wszystkie przedstawione poniżej badania własne przeprowadzono na samicach owcy rasy Merynos Polski, w modelu doświadczalnym opartym na naturalnym, wolnym od ingerencji farmakologicznej, cyklu płodności. Merynos Polski jest rasą owcy należącą do gatunków sezonowo poliestralnych. Okres estralny, charakteryzujący się następstwem kolejnych 16-18–dniowych cykli owulacyjnych, występuje w klimacie umiarkowanym w miesiącach jesienno-zimowych, a więc w warunkach krótkiego dnia. Jeżeli nie dojdzie do zapłodnienia, to taka długość sezonu rozrodczego gwarantuje wystąpienie około 10 kolejnych cykli. Wydłużający się pod koniec zimy, bądź na początku wiosny, dzień jest natomiast sygnałem do zahamowania aktywności płciowej i wejścia w okres anestralny.



Rys. Schemat cyklu estralnego owcy z uwzględnieniem poszczególnych jego faz

Wystąpienie owulacji u samic sprawdzano dwukrotnie w ciągu dnia przy użyciu samca poddanego uprzednio zabiegowi wazektomii i określano jako dzień 0 (Rys. Schemat cyklu estralnego owcy z uwzględnieniem poszczególnych jego faz). W doświadczeniach użyto tylko

te samice, które wykazywały regularne cykle owulacyjne (co najmniej dwa). Stan jajników oceniano również po eutanazji, analizując w nich obecność pęcherzyków jajnikowych o określonych wymiarach oraz ciałka żółtego.

Merynos Polski jest doskonale przystosowany do warunków środowiska i rodzimych systemów utrzymania; w Polsce obecność Merynosa datuje się od 1786 roku. Jest to rasa ustabilizowana genetycznie, co czyni ją dobrym modelem doświadczalnym, powszechnie uznanym w badaniach nad neuroendokrynnymi mechanizmami regulacji procesów rozrodczych (Domański i wsp., 1993; Tomaszewska i wsp., 2002; Łapot i wsp., 2007; Ciechanowska i wsp., 2011).

W celu weryfikacji oraz uzupełnienia już istniejących danych, w pierwszym etapie badań określono poziomy GnRH i GnRHR w okolicy przedwzrokowej, w wybranych obszarach podwzgórza (podwzgórze przednie i brzuszno-przyśrodkowe oraz szypuła wyniosłości pośrodkowej) oraz GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej (**publikacja 3**). Mimo iż okolica przedwzrokowa pod względem anatomicznym nie należy do podwzgórza, to pod względem funkcjonalnym tworzy z nim integralną całość. Dlatego też, w dalszej części opracowania prezentującego osiągniecie habilitacyjne, uwzględniono funkcjonalne powiązania pomiędzy tymi obszarami mózgu. Analizę poziomów biosyntezy GnRH i GnRHR przeprowadzono u owiec anestralnych oraz u samic w fazach pęcherzykowej i ciałka żółtego cyklu estralnego przy użyciu testu immunoenzymatycznego ELISA. Analizę tę uzupełniono badaniem stężenia LH w osoczu krwi. Krew pobierano w odstępach dziesięciominutowych, przez pięć kolejnych godzin. Poziom LH oznaczano metodą radioimmunologiczną podwójnych przeciwciał według Stupnickiego i Madeja (1976).

W badaniach wykazano, że poziomy GnRH w podwzgórzu anestralnych owiec są istotnie niższe, niż stwierdzone u samic w fazie pęcherzykowej, lecz nie zawsze niż w fazie ciałka żółtego cyklu estralnego. Odnotowane różnice mogą wynikać z odmiennych w poszczególnych stanach fizjologicznych mechanizmów synaptycznego dopływu sygnałów do neuronów GnRH, zwłaszcza że plastyczność synaptyczna układu GnRH, czyli zdolność do modyfikowania synaps, jest udokumentowana (Jansen i wsp., 2003). Ta morfologiczna zmienność komórek może regulować dopływ sygnałów aferentnych z różnych układów neuronalnych podwzgórza, uczestniczących w estrogenowej kontroli czynności sekrecyjnej neuronów GnRH. Takie przypuszczenie wydaje się zasadne, tym bardziej, że jak już wcześniej wspomniano, funkcja wielu neuroprzekaźników i neuropeptydów w regulacji

uwalniania GnRH może zmieniać się w poszczególnych stanach fizjologicznych. Dla przykładu, w okresie anestralnym neurony systemu dopaminy podwzgórzowej tworzą podstawową część neuronalnego mechanizmu hamującego uwalnianie GnRH/LH (Adams i wsp., 2006). Pod koniec *anestrus* aktywność dopaminowa ulega znacznemu zmniejszeniu, a jej obniżony poziom w cyklu estralnym powoduje wzrost pulsacyjnego uwalniania GnRH/LH (Goodman i wsp. 2000). β-endorfina, z kolei, hamuje sekrecję GnRH/LH w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, lecz w sezonie anestralnym nie odgrywa istotnej roli w kontroli uwalniania tych hormonów (Tortonese, 1999). Infuzje CRH do III komory mózgu owiec, przeprowadzane w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, mogą powodować zahamowanie przedowulacyjnego wylewu gonadotropin (Polkowska i Przekop, 1997), chociaż podawanie CRH nie wpływa na podstawowy poziom sekrecji LH u anestralnych i estralnych samic, zarówno nienaruszonych (intakty), jak i poddanych uprzednio zabiegowi owariektomii (Clarke i wsp., 1990; Caraty i wsp., 1997). Poziom Kiss 1 w podwzgórzu w okresie anestralnym jest znacząco niższy niż w okresie estralnym. Przeciwnie, wysokie poziomy RFRP3 u anestralnych owiec w porównaniu z samicami estralnymi (Smith i wsp., 2008), mogą sugerować pośredniczenie tego neuropeptydu w negatywnej estrogenowej kontroli sekrecji GnRH w okresie anestralnym.

Ze względu na fakt, że większość perykarionów GnRH jest umiejscowiona w okolicy przedwzrokowej, należałoby przypuszczać, że poziom białka GnRH, przynajmniej u samic w fazie pęcherzykowej, powinien być zdecydowanie wyższy w tym obszarze w porównaniu z innymi tkankami objętymi analizą (ewentualnie z wyjątkiem wyniosłości pośrodkowej, w której neurohormon jest magazynowany). Niespodziewanie taka zależność nie została zaobserwowana w prezentowanych badaniach własnych. Istotną przyczyną tych pozornie sprzecznych wyników może być zastosowana metoda analityczna (pomiar względny, wobec białka całkowitego). Ponadto, badania własne przeprowadzono na owcach w późnej fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, tuż przed wylewem GnRH/LH. Niewykluczone, że w tym okresie różnice w poziomach GnRH w poszczególnych obszarach podwzgórza mogą być u tej rasy owiec słabiej wyrażone. Ta ostatnia opinia wydaje się również zasadna, zwłaszcza że poziom GnRH w podwzgórzu owiec w fazie pęcherzykowej jest istotnie wyższy w porównaniu z odnotowanym u samic anestralnych.

W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano, po raz pierwszy, obecność białka GnRHR w różnych obszarach podwzgórza owcy. W porównaniu z okresem anestralnym, poziomy GnRHR w obydwu grupach samic estralnych były znamiennie wyższe

we wszystkich analizowanych obszarach podwzgórza (okolica przedwzrokowa, podwzgórze przednie i brzuszno-przyśrodkowe, szypuła wyniosłości pośrodkowej). Podobną zależność odnotowano również w przysadce. Na szczególną uwagę zasługuje znacząco wyższa ekspresja GnRHR w obszarze podwzgórza przedniego i brzuszno-przyśrodkowego samic w fazie ciałka żółtego cyklu estralnego w porównaniu z owcami w fazie pęcherzykowej cyklu, zwłaszcza że w przysadce stwierdzono zależność odwrotną. Wydaje się zatem, że mechanizmy regulacji ekspresji GnRHR w podwzgórzu mogą być specyficzne gatunkowo, a odnotowane różnice wynikają z odmiennego działania progesteronu na poziom ekspresji GnRHR w tej strukturze u owcy (Whitelaw i wsp., 2012), na przykład w porównaniu ze szczurem (Jennes i wsp., 1997). Mniej skomplikowaną jest sytuacja odnotowana w przysadce, w której ekspresja GnRHR jest ściśle związana z poziomem estradiolu, progesteronu oraz częstotliwością pulsów uwalnianego GnRH (Turzillo i wsp., 1998; Rispoli i Nett, 2005). Niski poziom GnRHR, wykazany w przysadce anestralnych owiec, jest niewątpliwie spowodowany obniżoną w tym okresie sekrecją estradiolu i zmniejszonym pobudzaniem komórek gonadotropowych przez GnRH. Obniżony poziom GnRHR w komórkach gonadotropowych samic w fazie ciałka żółtego w porównaniu z owcami w fazie pęcherzykowej cyklu jest prawdopodobnie wynikiem działania progesteronu, ponieważ w przysadce, odmiennie niż w podwzgórzu, progesteron przeciwdziała wzrostowi ekspresji GnRHR indukowanemu przez estradiol (Turzillo i wsp., 1998).

Mimo iż w prezentowanych badaniach własnych nie określano poziomu GnRH w splocie naczyniowym krążenia wrotnego podwzgórzowo-przysadkowego, to istotne zmiany w sekrecji LH w poszczególnych stanach fizjologicznych, wskazują również na znaczne różnice w uwalnianiu GnRH. Ta informacja, w połączeniu z analizą poziomów biosyntezy GnRH i GnRHR oraz poziomów transkryptu dla liganda i receptora (Ciechanowska i wsp., 2010), sugerują, że obniżenie biosyntezy GnRH w podwzgórzu oraz GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej, a także specyficzne zmiany w ekspresji GnRHR w podwzgórzu, to jedne z mechanizmów obniżenia sekrecji GnRH/LH i zaniku procesów owulacji podczas długich dni charakterystycznych dla sezonu anestralnego.

U owcy, gatunku o sezonowym charakterze rozrodczym, stan anestralny indukowany okołoroczną zmianą długości dnia jest związany, przede wszystkim z obniżeniem częstotliwości pulsów GnRH przez estradiol. Najlepiej udokumentowane pośrednictwo w mechanizmie ujemnego sprzężenia zwrotnego estradiolu na uwalnianie GnRH w tym

okresie ma dopamina (Tortonese i Lincoln, 1994; Adams i wsp., 2006; Goodman i wsp., 2010). Kolejne badania własne miały udzielić odpowiedzi na pytanie - czy farmakologiczne zablokowanie aktywności sekrecyjnej neuronów dopaminy w podwzgórzu anestralnych owiec może pobudzać uwalnianie GnRH/LH na poziomie biosyntezy GnRH i GnRHR i jakie podwzgórzowe mechanizmy są zaangażowane w regulację tego procesu? W tym celu określono współzależności między biosyntezą GnRH i GnRHR w podwzgórzu oraz GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej, a uwalnianiem LH po zablokowaniu receptorów dopaminy typu D2 przez infuzje małych dawek antagonisty tych receptorów (sulpiryd), przeprowadzane do III komory mózgu anestralnych samic. Analizowano również wpływ sulpirydu na poziomy ekspresji mRNA Kiss 1 w okolicy przedwzrokowej i w jądrze łukowatym podwzgórza brzuszno-przyśrodkowego oraz mRNA kodującego RFRP3 w jądrze przykomorowym podwzgórza przedniego i w jądrze grzbietowo-przyśrodkowym środkowego obszaru tej struktury (**publikacja 4**). Założono, że dopamina obniża ekspresję GnRH, podobnie jak uwalnianie neurohormonu (Goodman i wsp., 2012), przez hamowanie sygnałów pobudzających, docierających do neuronów GnRH z układu Kiss 1 w podwzgórzu. Dwa tygodnie przed rozpoczęciem doświadczeń owcom implantowano do trzeciej komory mózgu kaniule ze stali nierdzewnej, z zastosowaniem techniki stereotaktycznej (Traczyk i Przekop, 1963). Dokomorowe infuzje sulpirydu przeprowadzano w sposób pulsacyjny, przez 4 kolejne dni, przy użyciu pompy do mikroiniekcji. Kontrolę dla owiec poddanych działaniu sulpirydu stanowiły samice otrzymujące infuzje płynu Ringera. Analizę ekspresji mRNA Kiss 1 i mRNA RFRP3 przeprowadzono przy użyciu techniki reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą produktu w czasie rzeczywistym (Real-time PCR).

Przeprowadzone badania wykazały, że podanie sulpirydu powoduje znamienny wzrost poziomów GnRH i GnRHR w podwzgórzu oraz GnRHR w przysadce. Podwyższona sekrecja LH była wynikiem zwiększonej częstotliwości pulsów uwalnianego hormonu, gdyż amplituda pulsów nie uległa istotnym zmianom. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami innych autorów (Pau i wsp., 1982; Havern i wsp., 1994; Bertrand i wsp., 1999), którzy w różnych modelach doświadczalnych wykazali, że zniesienie aktywności dopaminowej w okresie anestralnym wzmaga czynność sekrecyjną układu gonadotropowego u owcy.

Infuzje sulpirydu przyczyniły się również do zwiększenia poziomu mRNA kodującego Kiss 1 w jądrze łukowatym. Tak więc jednym z mechanizmów, poprzez które dopamina obniża ekspresję potranskrypcyjnego (Ciechanowska i wsp., 2008) i potranslacyjnego produktu genu *GnRH* może być hamowanie aktywności sekrecyjnej

neuronów Kiss 1 w tym obszarze podwzgórza. Za takim poglądem przemawiają inne badania w modelu owcy, w których farmakologiczne zablokowanie receptorów kisspeptyny (Kiss1r) w podwzgórzu znosiło pobudzanie impulsacji GnRH przez antagonistę receptorów D2 (Goodman i wsp., 2012). Brak odpowiedzi neuronów Kiss 1 z okolicy przedwzrokowej na sulpiryd nie jest zaskoczeniem, ponieważ neurony Kiss 1 z tego obszaru są włączone w mechanizm pozytywnego wpływu estradiolu na uwalnianie GnRH, który indukuje wylew GnRH/LH, a nie w sezonową kontrolę pulsacyjnej sekrecji GnRH. W oparciu o wyżej przedstawione wyniki sformułowano kolejną hipotezę zakładającą, że zmniejszenie dopływu sygnałów pobudzających do neuronów GnRH w okresie anestralnym, może zwiększać udział podwzgórzowych szlaków tłumiących sekrecję neurohormonu. Do tej hamującej funkcji wytypowano neurony RFRP3, ponieważ aktywność sekrecyjna tych komórek w podwzgórzu owcy wzrasta znacząco w okresie anestralnym (Smith i wsp., 2008). Hipoteza ta zyskała przynajmniej częściowe wsparcie w prezentowanych badaniach własnych, gdy infuzje sulpirydu obniżyły poziom transkryptu dla RFRP3 w jądrze przykomorowym. Należy jednak zaznaczyć, że poziom mRNA nie musi być miarodajnym wykładnikiem poziomu powstającego białka, gdyż stabilność transkryptu jest regulowana przez potranskrypcyjne procesy, w wyniku których cząsteczki mRNA mogą ulegać również degradacji.

Dokładna natura wpływu dopaminy na molekularne procesy wiodące do biosyntezy GnRH pozostaje wciąż słabo sprecyzowana. Jednakże istnienie receptorów D2 na ponad 50% neuronów GnRH i na większości komórek Kiss 1 (Goodman i wsp., 2012) oraz łączność anatomiczna neuronów GnRH i RFRP3 (Smith i wsp., 2008) sugerują, że wpływ ten może być zarówno bezpośredni, jak i pośredni. Analizy immunohistochemiczne wskazują ponadto, że charakter wpływu dopaminy na neurosekrecyjny układ GnRH zależy od obszaru podwzgórza, w którym obecne są komórki GnRH (Goodman i wsp 2010). Wydaje się również, że w tej sieci wzajemnych powiązań dopamina-RFRP3-GnRH, hierarchia może być częściowo odwrócona, zwłaszcza że neurony RFRP3 wysyłają swoje projekcje do różnych obszarów mózgu, także do układu dopaminy podwzgórzowej. Niewykluczone, że nadrzędną funkcję w tej hierarchicznej kontroli mogłaby pełnić populacja komórek RFRP3 obecna w jądrze grzbietowo-przyśrodkowym, lecz wyjaśnienie tego zagadnienia wymaga dalszych wnikliwych badań. Ponadto przedmiotem kolejnych dociekań naukowych, zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów regulacji sekrecji GnRH/LH u owcy w okresie anestralnym, powinna być analiza wzajemnych powiązań w układzie Kiss1-RFRP3. Inspiracją do podjęcia takich badań są dane pochodzące z doświadczeń na gryzoniach

laboratoryjnych, które dowiodły, że RFRP3 może wpływać na aktywność neuronów Kiss1, szczególnie tych z obszaru jądra łukowatego (Poling i wsp., 2013), za pośrednictwem swoistego receptora, obecnego również w podwzgórzu owcy (Smith i wsp., 2012).

Odnotowany w badaniach własnych wzrost poziomów GnRHR w podwzgórzu i przysadce w odpowiedzi na sulpiryd wyraźnie sugeruje, że dopamina wywiera hamujący wpływ także na ekspresję genu kodującego *GnRHR*. Zwiększona ekspresja GnRHR w przysadce, wywołana działaniem sulpirydu, jest prawdopodobnie wynikiem wzmożonej częstotliwości pulsów uwalnianego GnRH i w następstwie tych procesów przyczyną wzrostu pulsacyjnej sekrecji LH. Wzrost poziomów GnRHR w poszczególnych obszarach podwzgórza po podaniu sulpirydu, w zestawieniu ze zróżnicowaną ekspresją mRNA GnRHR, wykazaną w tych samych tkankach (Ciechanowska i wsp., 2008), wyraźnie wskazuje, że w tym przypadku relacja między transkrypcją i translacją jest daleka od prostej zależności. Wydaje się zatem, że potranskrypcyjna modyfikacja ekspresji genu kodującego *GnRHR* jest włączona w mechanizmy, poprzez które dopamina reguluje sekrecję GnRH/LH.

Pomimo licznych prac poświęconych wpływowi β-endorfiny na uwalnianie GnRH/LH u różnych gatunków, rola tego neuromodulatora w regulacji biosyntezy GnRH oraz GnRHR nie była przedmiotem żadnej analizy badawczej. To skłoniło do oceny wpływu aktywacji i zablokowania receptorów opioidowych typu μ na poziomy ekspresji genu *GnRH* i *GnRHR* **(publikacja 1)**. Ze względu na fakt, że podwzgórzowy układ endogennych opioidów jest głównym pośrednikiem estrogenowej kontroli sekrecji gonadotropin w przebiegu cyklu estralnego, a udział β-endorfiny w regulacji sekrecji GnRH/LH dotyczy przede wszystkim fazy pęcherzykowej cyklu (Chalivoix i wsp., 2010), przedstawione badania własne przeprowadzono na owcach w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego. W zależności od grupy doświadczalnej, zwierzętom podawano odpowiednio roztwory β-endorfiny lub antagonisty receptorów opioidowych (nalokson). Infuzje prowadzono przez 4 kolejne dni, poczynając od 13 dnia cyklu estralnego.

Wyniki przedstawionych badań wykazały, że układ β-endorfiny podwzgórzowej jest istotną częścią neuronalnego mechanizmu hamującego biosyntezę GnRH w podwzgórzu owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego. Aktywacja receptorów opioidowych typu μ, wywołana przez dokomorowe infuzje β-endorfiny, spowodowała istotne obniżenie poziomów GnRH we wszystkich analizowanych obszarach tej struktury, a działanie naloksonu było przeciwstawne. Podobny kierunek zmian odnotowano także w przypadku wpływu agonisty

i antagonisty receptorów μ na poziom ekspresji GnRHR w podwzgórzu i przysadce oraz na stężenie LH w osoczu krwi.

Ze względu na brak dowodów naukowych charakteryzujących wpływ układu β-endorfiny podwzgórzowej na molekularne procesy neuroendokrynnej kontroli aktywności układu GnRH, o wzajemnych powiązaniach między tymi sieciami neuronów w aspekcie molekularnym można wnioskować jedynie pośrednio, w oparciu o przedstawione poniżej dane z piśmiennictwa. Wydaje się, że β-endorfina może regulować uwalnianie GnRH/LH, poprzez hamowanie aktywności transkrypcyjnej (Ciechanowska i wsp., 2008) oraz translacyjnej genu *GnRH*, działając bezpośrednio w komórkach docelowych, zwłaszcza że neurony GnRH wykazują ekspresję receptorów μ-opioidowych (Smith i Jennes, 2001). Za takim modelem kontroli przemawia również anatomiczna łączność, to jest istnienie połączeń synaptycznych, neuronów β-endorfiny z komórkami GnRH (Jansen i wsp., 2003). Nie można jednak wykluczyć pośredniego wpływu β-endorfiny na poziom biosyntezy GnRH, poprzez inne szlaki neuronalne podwzgórza, w tym neurony systemu katecholaminergicznego, GABA czy dopaminy podwzgórzowej (Dobson i wsp., 2003). Obniżony w odpowiedzi na β-endorfinę, lub podwyższony działaniem naloksonu poziom GnRHR w przysadce jest prawdopodobnie wynikiem odpowiednich zmian w uwalnianiu GnRH, który jest głównym czynnikiem wzmagającym ekspresję i aktywność GnRHR w komórkach gonadotropowych.

Rola fizjologiczna GnRHR w podwzgórzu jest dotychczas praktycznie nieznana, choć nieliczne badania na szczurach sugerowały, że mRNA GnRHR w podwzgórzu brzuszno-przyśrodkowym uczestniczy w kontroli uwalniania GnRH, natomiast nie wpływa na ekspresję genu tego neurohormonu w okolicy przedwzrokowej (Seong i wsp., 1998). Należy jednak podkreślić, że dotychczas stwierdzono jedynie obecność GnRHR w różnych obszarach podwzgórza u owcy. Nie wiadomo jednak jakie podwzgórzowe szlaki wykazują ekspresję GnRHR. Przyjmując hipotezę, że GnRHR są obecne w różnych układach neuronalnych podwzgórza, wykazujących zróżnicowaną wrażliwość na β-endorfinę, ale także wywierających różny wpływ na ekspresję genu *GnRH*, można by przypuszczać, że obecny w podwzgórzu GnRHR uczestniczy w regulacji ekspresji genu *GnRH* w poszczególnych obszarach tej struktury i/lub uwalnianiu neurohormonu z zakończeń nerwowych usytuowanych w wyniosłości pośrodkowej. Na tym etapie badań sugestia ta może stanowić jedynie hipotezę roboczą, której rozwikłanie wymaga dalszych pogłębionych analiz. Z drugiej jednak strony, analiza poziomów GnRHR w różnych stanach fizjologicznych raczej eliminuje

udział podwzgórzowego GnRHR w sezonowej kontroli uwalniania GnRH, zwłaszcza że poziomy biosyntezy GnRHR w podwzgórzu owiec estralnych były istotnie wyższe w porównaniu z odnotowanymi w poszczególnych obszarach tej struktury (także w podwzgórzu brzuszno-przyśrodkowym) u samic anestralnych. Gdyby obecne w podwzgórzu receptory były istotne dla sezonowej kontroli uwalniania GnRH, to biorąc pod uwagę ich udział w mechanizmie uwalniania GnRH sugerowanym u szczura (DePaolo i wsp., 1987), poziom biosyntezy GnRHR w podwzgórzu, zwłaszcza u owiec w fazie pęcherzykowej, powinien ulec obniżeniu względem okresu anestralnego.

Mając na uwadze fakt, że różnego rodzaju stresory wywierają zdecydowanie negatywne działanie na czynność układu rozrodczego (Dobson i wsp., 2003) oraz jedynie nieliczne istniejące prace poświęcone ekspresji genów *GnRH* i *GnRHR* w warunkach stresogennych, kolejne badania poświęcono wpływowi stresu na poziomy biosyntezy GnRH i GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym oraz na sekrecję LH u owiec anestralnych i samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego (**publikacja 2**).

Jako czynnik stresogenny zastosowano łagodne impulsy prądu elektrycznego (I=3mA), przekazywane w sposób pulsacyjny na przednie kończyny zwierzęcia, na poziomie śródręcza (szok elektryczny, z ang. footshock) w ciągu 0,5 sekundy, po czym następowała 1 sekunda przerwy. Po 20 minutach przerywano stymulację na 40 minut, po których następował kolejny 20-minutowy cykl drażnienia. Podczas doświadczeń owce poddawano odpowiednio: stresowi krótkiemu, trwającemu 3 godziny dziennie w ciągu jednego dnia, lub stresowi o przedłużonym działaniu, trwającemu 5 godzin dziennie przez cztery kolejne dni. Kontrolnymi dla owiec poddawanych działaniu czynników stresogennych były samice niestresowane. Użyte procedury stresu, zarówno krótkiego, jak i o przedłużonym działaniu, były zgodne z wcześniej opracowanym modelem doświadczalnym (Przekop i wsp., 1984). Należy podkreślić, że przy wyborze stresora kierowano się dobrem zwierzęcia. Footshock jest czynnikiem stresogennym, który nie wywołuje u owiec dotkliwego bólu, a jedynie przejściowe zaburzenia natury psychoemocjonalnej.

Wyniki prezentowanych badań wykazały, po raz pierwszy, że stres w specyficzny sposób moduluje biosyntezę GnRH i GnRHR; wpływ stresu zależy od stanu fizjologicznego zwierzęcia oraz od czasu oddziaływania bodźca stresogennego. Poddanie owiec anestralnych stresowi krótkotrwałemu spowodowało wzrost poziomów GnRH w podwzgórzu. Podobnie jak w przypadku liganda, wzrost biosyntezy GnRHR odnotowano we wszystkich

analizowanych obszarach tej struktury oraz w przysadce, choć w podwzgórzu brzuszno-przyśrodkowym nie wykazywał on cech znamienności statystycznej. Zastosowanie przedłużonej procedury stresogennej w okresie anestralnym zwiększało, nie miało wpływu, lub zmniejszało ekspresję GnRH i GnRHR, a obserwowany efekt zależał od analizowanego obszaru podwzgórza. Zwiększoną sekrecję LH wykazano jedynie u anestralnych samic poddanych krótkotrwałej stymulacji.

U samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, poddanych czynnikom stresogennym o krótkotrwałym działaniu, poziomy GnRH w podwzgórzu oraz GnRHR w tej strukturze i w przysadce były istotnie wyższe w porównaniu z poziomami wykazanymi u zwierząt w grupie kontrolnej. Ponadto krótkotrwała stymulacja indukowała wzrost sekrecji LH, podczas gdy przedłużone stosowanie stresora obniżyło poziomy GnRH i GnRHR w podwzgórzu oraz GnRHR w przysadce, a także stężenie LH w osoczu. Te informacje, w połączeniu z wynikami, jedynie nielicznych, eksperymentów poświęconych molekularnym aspektom reakcji stresowej u szczura i owcy, sugerują, że ekspresja GnRH i GnRHR w podwzgórzu/przysadce zależy również od płci zwierzęcia (Gruenewald i Matsumoto, 1993) i rodzaju zastosowanego czynnika stresogennego (Kang i wsp., 2000; Tanebe i wsp., 2000). Interpretacja zróżnicowanej w poszczególnych stanach fizjologicznych odpowiedzi układu GnRH/LH na działanie krótkiego i przedłużonego stresu nie jest zadaniem łatwym. Wydaje się jednak, że footshock, w zależności od stanu fizjologicznego, wpływa na ekspresję GnRH i GnRHR i konsekwentnie na uwalnianie LH, indukując zmiany w aktywności podwzgórzowych układów neuronalnych pośredniczących w estrogenowej kontroli sekrecji GnRH/LH. Wsparciem dla takiej hipotezy są dane wskazujące, że stres wywiera istotne działanie na aktywność sekrecyjną neuronów β-endorfiny (Przekop i wsp., 1990), GABA (Cullinan 2000), czy noradrenaliny podwzgórzowej (Przekop i Tomaszewska, 1996). Ponadto różne stresory aktywują oś HPA, i choć wszystkie składowe tej osi mają zazwyczaj hamujący wpływ na aktywność układu podwzgórzowo-przysadkowego, to jednak w niektórych przypadkach mogą stymulować jego czynność sekrecyjną (Caraty i wsp., 1997). W tym też można upatrywać przynajmniej jedną z przyczyn odmiennej odpowiedzi układu GnRH/LH na stres krótki i o przedłużonym działaniu. Z kolei, podłożem odmiennej w różnych obszarach podwzgórza ekspresji GnRH, odnotowanej u anestralnych samic poddanych przedłużonemu działaniu stresora, może być indukowany jego działaniem zróżnicowany dopływ sygnałów aferentnych do neuronów GnRH zlokalizowanych w poszczególnych przedziałach tej struktury.

Odnotowany, wielokrotnie w przedstawionych badaniach własnych, podobny kierunek zmian biosyntezy GnRH w podwzgórzu i GnRHR w przysadce oraz stężeń LH w osoczu krwi sugeruje, że regulacja aktywności sekrecyjnej układu GnRH/LH w warunkach stresogennych, może zachodzić na poziomie biosyntezy GnRH i GnRHR. Wydaje się zatem, że zakłócenia sekrecji gonadotropin i procesów owulacji u zwierząt narażonych na czynniki stresogenne środowiska mogą być następstwem nie tylko zaburzeń w pulsacyjnym sposobie uwalniania GnRH, lecz także zmian w biosyntezie neurohormonu i aktywnych form receptora w podwzgórzu oraz GnRHR w przednim płacie przysadki mózgowej. Ponadto okołoroczne zmiany aktywności sekrecyjnej układów neuronalnych zaangażowanych w kontrolę uwalniania GnRH/LH, mogą przyczyniać się do zróżnicowanych w odpowiedzi na stres poziomów ekspresji genów *GnRH* i *GnRHR* w okresie anestralnym i w przebiegu cykli estralnych.

Poszukując dalej mechanizmów, poprzez które stres zakłóca sekrecję gonadotropin, przeprowadzono kolejne badania, których przedmiotem była analiza wpływu CRH oraz antagonisty receptorów CRH (CRH-A) na poziomy (i) potranslacyjnych produktów genów kodujących *GnRH* i *GnRHR* oraz na poziom LH w osoczu krwi, (ii) na ekspresję mRNA genów kodujących *Kiss1* w okolicy przedwzrokowej i w jądrze łukowatym podwzgórza brzuszno-przyśrodkowego oraz *Kiss1r* w wybranych obszarach podwzgórza (okolica przedwzrokowa, podwzgórze przednie i brzuszno-przyśrodkowe oraz szypuła wyniosłości pośrodkowej). Jako wskaźnik aktywności sekrecyjnej nadnerczy określano poziom kortyzolu w krwi obwodowej z zastosowaniem techniki ELISA. Wszystkie te zależności badano u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, otrzymujących CRH i CRH-A w postaci dokomorowych infuzji (**publikacja 5**).

W ramach prowadzonych badań dowiedziono, po raz pierwszy, że infuzja CRH spowodowała istotne obniżenie poziomów biosyntezy GnRH we wszystkich analizowanych obszarach podwzgórza. Podobny efekt odnotowano także w przypadku wpływu agonisty receptorów CRH na sekrecję LH. Podanie CRH do III komory mózgu obniżyło również poziomy GnRHR w przysadce i w zdecydowanej większości analizowanych obszarów podwzgórza, z wyjątkiem okolicy przedwzrokowej, w której odnotowano wzrost poziomu GnRHR. Ponadto infuzja CRH przyczyniła się do zmniejszenia poziomów transkryptu dla Kiss 1 i Kiss1r w podwzgórzu oraz do podwyższenia sekrecji kortyzolu. Wszystkie przeprowadzone analizy wykazały, że działanie CRH-A jest przeciwstawne do wpływu

wywieranego przez CRH. Uzyskane w badaniach własnych dane różnią się od wyników wcześniejszych doświadczeń przeprowadzonych na owcach, które wykazały, że ośrodkowe lub obwodowe podawanie CRH pobudza (Caraty i wsp., 1997), bądź pozostaje bez wpływu na sekrecję LH (Clarke i wsp., 1990). Z drugiej strony, obecne obserwacje są zgodne, przynajmniej częściowo, z opisanymi przez Polkowską i Przekopa (1997), którzy dowiedli, że infuzja CRH, przeprowadzona do III komory mózgu owiec w okresie przedowulacyjnym, tłumi wylew LH i przedłuża cykl estralny. Najbardziej prawdopodobną przyczyną tych, często sprzecznych, wyników był zróżnicowany status hormonalny organizmu zwierząt użytych w poszczególnych eksperymentach, a w szczególności różny poziom steroidów płciowych, które wydają się być niezwykle istotne dla oddziaływań między osiami HPA i HPG.

Wyniki badań własnych wyraźnie sugerują, że infuzje CRH i CRH-A do III komory mózgu wpływają na aktywność podwzgórzowo-przysadkowego układu GnRH/LH poprzez różne pośrednie, ośrodkowe i obwodowe, mechanizmy. Zgodnie z tym przekonaniem, mechanizmy ośrodkowe mogą angażować neurony Kiss 1 w podwzgórzu i dotyczą hamowania lub pobudzania biosyntezy GnRH i GnRHR przez sygnały pochodzące z układu Kiss 1. Mechanizmy obwodowe obejmują natomiast działanie kortyzolu na przysadkę i dotyczą wpływu tego kortykosteroidu na poziom sekrecji LH. Wyniki uzyskane w badaniach własnych potwierdziły wcześniejsze doniesienia z innych ośrodków, wskazujące, że kortyzol może modulować aktywność układu GnRH/LH, działając bezpośrednio w komórkach gonadotropowych (Breen i Karsch, 2004) lub pośrednio, przez inne neurony na poziomie podwzgórza (Oakley i wsp., 2009). Tezę o istotnej roli Kiss 1 w regulacji biosyntezy GnRH wspiera także fakt istnienia projekcji neuronów Kiss 1 z okolicy przedwzrokowej i jądra łukowatego do komórek GnRH (Backholer i wsp., 2009; Merkley i wsp., 2015). W kontekście fizjologicznym, pośredniczenie neuronów Kiss 1 w indukowanym działaniem CRH obniżeniu biosyntezy GnRH, jest w pełni uzasadnione, biorąc pod uwagę brak możliwości bezpośredniego dopływu sygnałów do neuronów GnRH w okolicy przedwzrokowej z komórek CRH obecnych w jądrze przykomorowym (Rivalland i wsp., 2006). Ponadto wyniosłość pośrodkowa powinna być również rozpatrywana jako miejsce komunikacji między układami Kiss1 i GnRH, zwłaszcza że anatomiczna łączność między tymi dwiema populacjami neuronów została w tym obszarze udokumentowana (Ghuman i wsp., 2010). Pozostaje jednak wątpliwość, czy komórki Kiss 1 u owcy wykazują ekspresję receptorów

CRH, choć analizy anatomiczne wskazują na możliwość interakcji między tymi dwoma układami neuronalnymi (Fergani i wsp., 2013).

Wzrost poziomu kortyzolu po infuzjach CRH oraz jego obniżenie po podaniu CRH-A, wskazują, że infundowane substancje uzyskały dostęp do przysadki, z której uwalniany jest hormon adrenokortykotropowy. Jest to wysoce prawdopodobne, tym bardziej, że przerwanie łączności anatomicznej między podwzgórzem i przysadką nie znosi okołodobowego rytmu pulsacyjnej sekrecji kortyzolu (Walter i wsp., 2010), sugerując tym samym, że podwzgórzowy CRH nie jest niezbędny dla wyzwalania pulsacyjnej sekrecji hormonu nadnerczy. Ponadto obniżenie poziomów GnRHR w przysadce po podaniu CRH do III komory mózgu mogłoby wynikać ze zmniejszonej stymulacji komórek gonadotropowych przez GnRH. Jednak z perspektywy istnienia mechanizmów homeostatycznych należałoby przewidzieć wzrost biosyntezy GnRHR w przysadce, po to by organizm mógł skorygować niedobór GnRH. Co istotne, takie działanie kompensacyjne nie było obserwowane w prezentowanych badaniach. Może to sugerować, że infuzja CRH działała bezpośrednio, lub za pośrednictwem innego mechanizmu na przysadkę mózgową, hamując w niej biosyntezę GnRHR. Prezentowane badania własne wspierają hipotezę, że ta pośrednia funkcja mogła być pełniona przez kortyzol, który obniżając poziom GnRHR w przysadce zmniejszył wrażliwość komórek gonadotropowych na GnRH.

Uzyskane wyniki stanowią również podstawę dla kolejnej ważnej interpretacji: neurony Kiss 1 w podwzgórzu mogą pośredniczyć w negatywnym wpływie kortyzolu wywieranym na biosyntezę GnRH i GnRHR w tej strukturze. Sugeruje się bowiem, że kortyzol wpływa na ekspresję genu *GnRH* poprzez hamowanie sygnałów pobudzających, docierających do neuronów GnRH z komórek Kiss 1 obecnych w okolicy przedwzrokowej i jądrze łukowatym. Możliwość tę potwierdzają badania na gryzoniach laboratoryjnych, które wykazały, że zarówno indukowane stresem wydzielanie glikokortykoidów, jak również podawanie tych hormonów, obniża poziom mRNA Kiss 1 w podwzgórzu, podczas gdy warunki, które nie wpływają na sekrecję hormonów nadnerczy, nie zmieniają również ekspresji mRNA Kiss 1 (Wang, 2012). Ponadto zaburzeniom behawioru seksualnego i przedowulacyjnego wylewu LH u owcy w warunkach stresu immunologicznego towarzyszyło hamowanie aktywności komórek Kiss 1, zarówno w okolicy przedwzrokowej, jak i w jądrze łukowatym (Fergani i wsp., 2013). Uzasadnioną nadzieję budzi również istnienie receptorów dla glikokortykoidów w układzie Kiss 1, zwłaszcza że receptory glukokortykoidowe typu 2 występują obficie w okolicy przedwzrokowej i w jądrze

łukowatym u owcy (Dofourny i Skinner, 2002), w których obecne są również komórki Kiss 1. Uzyskane wyniki wyraźnie sugerują, że ośrodkowe infuzje CRH i CRH-A wpływają na biosyntezę GnRH/GnRHR i uwalnianie LH u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego angażując różne ośrodkowe i obwodowe mechanizmy. Należy jednak podkreślić, że prezentowane wyniki są nowatorskie, a ostateczne potwierdzenie sugerowanych mechanizmów wymaga następnych wnikliwych badań, których pierwszym etapem powinno być określenie zależności pomiędzy poziomami transkryptów i produktów potranslacyjnych dla Kiss 1 i Kiss1r.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

Badania przedstawione w ramach osiągnięcia habilitacyjnego wykazały, że (1) poziomy biosyntezy GnRH i GnRHR w podwzgórzu oraz GnRHR w przysadce zmieniają się w poszczególnych stanach fizjologicznych, a obniżenie ekspresji GnRH w podwzgórzu i GnRHR w przysadce oraz specyficzne zmiany w ekspresji GnRHR w podwzgórzu w okresie wydłużającego się dnia są włączone w mechanizmy inicjujące obniżenie pulsacyjnej sekrecji LH i stan anestralny, (2) układy neuronalne w podwzgórzu - dopaminy i β-endorfiny - uczestniczą, nie tylko w kontroli uwalniania GnRH/LH w poszczególnych stanach fizjologicznych, ale również w regulacji biosyntezy GnRH i GnRHR, (3) w obrębie klasycznych (dopamina) i później poznanych (Kiss 1, RFRP3) układów neuronalnych podwzgórza istnieje pewna hierarchia oddziaływań na molekularne procesy wiodące do biosyntezy GnRH i GnRHR, w której nadrzędną rolę pełnią raczej te pierwsze, choć w sieci wzajemnych powiązań dopamina-RFRP3 zależność odwrotna wydaje się również możliwa, (4) receptory GnRH znajdują się w różnych obszarach podwzgórza, a ich ekspresja może być regulowana przez obecne tam liczne układy neuroprzekaźników i neuromodulatorów, (5) stres w specyficzny sposób moduluje biosyntezę GnRH i GnRHR oraz sekrecję LH; wpływ stresu zależy od stanu fizjologicznego zwierzęcia oraz od czasu oddziaływania bodźca stresogennego, (6) mechanizmy, poprzez które stres zakłóca sekrecję GnRH/LH mogą obejmować bezpośredni wpływ kortyzolu na poziom uwalnianego LH oraz jego działanie pośrednie, angażujące neurony Kiss 1, wywierane na poziom biosyntezy GnRH/GnRHR .

Przeprowadzone badania wykazały, po raz pierwszy, że zakłócenia sekrecji gonadotropin i procesów owulacji mogą być następstwem nie tylko zaburzeń w pulsacyjnym sposobie uwalniania GnRH, lecz także zmian w biosyntezie neurohormonu oraz jego receptora, dowodząc tym samym, że klucz do płodności jest ukryty na poziomie molekularnym. Otrzymane wyniki, oprócz przedstawionej wartości poznawczej, mogą mieć w przyszłości także znaczenie aplikacyjne, zarówno w medycynie weterynaryjnej, jak i w medycynie ludzkiej, w zakresie leczenia niepłodności na tle zaburzeń sekrecji gonadotropin. Wydaje się bowiem, że dokładne sprecyzowanie molekularnych mechanizmów sekrecji gonadotropin w różnych stanach fizjologicznych, znacznie zwiększy szansę określenia przyczyny stanu patologicznego i tym samym przyczynową eliminację jego objawów, zwłaszcza w dobie coraz powszechniej stosownych biologicznych metod leczenia wielu schorzeń. Tak więc niekwestionowaną jest również potencjalna wartość diagnostyczna tych badań w kontekście radykalnego i skutecznego leczenia niepłodności. Przedstawione badania budzą również w pełni uzasadnioną nadzieję, że jako „stróż" płodności kisspeptyna jest obiecującym kandydatem do zastosowania w terapii niepłodności.

Piśmiennictwo

Adams VL, Goodman RL, Salm AK, Coolen LM, Karsch FJ, Lehman MN. Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. Endocrinology. 2006;147(10): 4843-4851.

Backholer K, Smith J, Clarke IJ. Melanocortins may stimulate reproduction by activating orexin neurons in the dorsomedial hypothalamus and kisspeptin neurons in the preoptic area of the ewe. Endocrinology. 2009; 150(12): 5488-5497.

Bertrand F, Thiéry J, Picard S, Malpaux B. Implication of D2-like dopaminergic receptors in the median eminence during the establishment of long-day inhibition of LH secretion in the ewe. J Endocrinol. 1999; 163(2): 243-254.

Breen KM, Karsch FJ. Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? Endocrinology. 2004; 145(2): 692-698.

Caldani M, Batailler M, Thiéry JC, Dubois MP. LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. Histochemistry. 1988; 89(2): 129-139.

Chalivoix S, Malpaux B, Dufourny L. Relationship between polysialylated neural cell adhesion molecule and beta-endorphin- or gonadotropin releasing hormone-containing neurons during activation of the gonadotrope axis in short daylength in the ewe. Neuroscience. 2010; 169(3): 1326-1336.

Caraty A, Miller DW, Delaleu B, Martin GB. Stimulation of LH secretion in sheep by central administration of corticotropin-releasing hormone. J Reprod Fertil. 1997; 111(2): 249-257.

Ciechanowska M, Łapot M, Malewski T, Misztal T, Mateusiak K, Przekop F. The effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the preoptic area-hypothalamus and GnRH-R gene in the stalk/median eminence and anterior pituitary gland in ewes during follicular phase of the estrous cycle. Acta Neurobiol Exp. 2007; 67(1): 1-12.

Ciechanowska MO, Łapot M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. The central effect of beta-endorphin and naloxone on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus, and on GnRH-R gene in the anterior pituitary gland in follicular phase ewes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008; 116(1), 40-46.

Ciechanowska M, Łapot M, Mateusiak K, Przekop F. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. Reprod Biol. 2010; 10 (2): 85-124.

Ciechanowska M, Łapot M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Effects of corticotropin-releasing hormone and its antagonist on the gene expression of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in the hypothalamus and anterior pituitary gland of follicular phase ewes. Reprod Fertil Dev. 2011; 23(6): 780-787.

Clarke IJ, Foulds LM, Hayward S, Cummins JT, Robertson DM. Analysis of the ratio of biological to immunological LH secreted during the oestrogen-induced LH surge in the ewe. J Endocrinol. 1990; 127(2): 217-222.

Cullinan WE. GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. J Comp Neurol. 2000; 419(3): 344-351.

DePaolo LV, King RA, Carrillo AJ. In vivo and in vitro examination of an autoregulatory mechanism for luteinizing hormone-releasing hormone. Endocrinology. 1987; 120(1): 272-279.

Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S, Smith R. A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. Reproduction. 2003; 125(2): 151-163.

Dofourny L, Skinner DC. Type II glucocorticoid receptors in the ovine hypothalamus: distribution, influence of estrogen and absence of co-localization with GnRH. Brain Res. 2002; 946(1): 79-86.

Domański E, Romanowicz K, Kerdelhue B. Enhancing effect of intracerebrally infused β-endorphin antiserum on the secretion of cortisol in foot-shocked sheep. Neuroendocrinology. 1993; 57(1): 127-131.

Fergani C, Routly JE, Jones DN, Pickavance LC, Smith RF, Dobson H. Kisspeptin, c-Fos and CRFR type 2 expression in the preoptic area and mediobasal hypothalamus during the follicular phase of intact ewes, and alteration after LPS. Physiol Behav. 2013; 110-111: 158-168.

Goodman R L, Jansen H T, Billings H J, Coolen LM, Lehman M N. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. J Neuroendocrinol. 2010; 22(7): 674-681.

Goodman R L, Maltby M J, Millar R P, Hileman S M, Nestor C C, Whited B, et al. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GnRH pulse frequency in check in anestrous ewes. Endocrinology. 2012; 153(12): 5918-5927.

Goodman RL, Thiery JC, Delaleu B, Malpaux B. Estradiol increases multiunit activity in the A15 area of ewes exposed to inhibitory photoperiods. Biol Reprod. 2000; 63(5): 1352-1357.

Gruenewald DA, Matsumoto AM. Reduced gonadotropin-releasing hormone gene expression with fasting in the male rat brain. Endocrinology. 1993; 132(1): 480-482.

Ghuman SP, Morris R, Spiller DG, Smith RF, Dobson H. Integration between different hypothalamic nuclei involved in stress and GnRH secretion in the ewe. Reprod Domest Anim. 2010; 45(6): 1065-1073.

Harris TG, Robinson JE, Evans NP, Skinner DC, Herbison AE. Gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression changes before the onset of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in the ewe. Endocrinology. 1998; 139(1): 57-64.

Havern R L, Whisnant C S, Goodman R L. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrous ewes. Endocrinology. 1994; 134(4): 1905-1914.

Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocr Rev. 1998; 19(3): 302-330.

Jansen HT, Cutter C, Hardy S, Lehman MN, Goodman RL. Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. Endocrinology. 2003; 144(8): 3663-3676.

Jennes L, Eyigor O, Janovick JA, Conn PM. Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. Recent Prog Horm Res. 1997; 52: 475-490.

Kang SS, Kim SR, Leonhardt S, Jarry H, Wuttke W, Kim K. Effect of interleukin-1beta on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in castrated male rats. J Neuroendocrinol. 2000; 12(5): 421-429.

Kang SH, Seong JY, Cho S, Cho H, Kim K. Acute increase of GABAergic neurotransmission exerts a stimulatory effect on GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized, estrogen- and progesterone-treated adult female rats. Neuroendocrinology. 1995; 61(5): 486-492.

Karsch FJ, Cummins JT, Thomas GB, Clarke IJ. Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. Biol Reprod. 1987; 36(5): 1207-1218.

Łapot M, Ciechanowska M, Malewski T, Misztal T, Mateusiak K, Przekop F. The effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor genes in the discrete regions of the hypothalamus and pituitary of anestrous ewes. Reprod Biol. 2007; 7(1): 55-71.

Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett. 2009; 583(24): 3966-3973.

Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL, Lehman MN. Evidence for changes in numbers of synaptic inputs onto KNDy and GnRH neurons during the preovulatory LH surge in the ewe. J Neuroendocrinol. 2015; 27: 624-635.

Nett TM. Regulation of genes controlling gonadotropin secretion. J Anim Sci. 1990; 68: 3-17.

Oakley AE, Breen KM, Clarke IJ, Karsch FJ, Wagenmaker ER, Tilbrook AJ. Cortisol reduces gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids. Endocrinology. 2009; 150(1): 341-349.

Pau KF, Kuehl D E, Jackson G L. Effect of frontal hypothalamic deafferentation on luteinizing hormone secretion and seasonal breeding in the ewe. Biol Reprod. 1982; 27(4): 999-1009.

Pierce BN, Hemsworth PH, Rivalland ET, Wagenmaker ER, Morrissey AD, Papargiris MM, et al. Psychosocial stress suppresses attractivity, proceptivity and pulsatile LH secretion in the ewe. Horm Behav. 2008; 54(3):424-434.

Poling MC, Quennell J H, Anderson G M, Kauffman A S. Kisspeptin neurons do not directly signal to RFRP-3 neurons but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. J. Neuroendocrinol. 2013; 25(10): 876-886.

Polkowska J, Przekop F. The effect of corticotropin-releasing factor (CRF) on the gonadotropin hormone releasing hormone (GnRH) hypothalamic neuronal system during preovulatory period in the ewe. Acta Neurobiol Exp. 1997; 57(2): 91-99.

Przekop F, Wolińska E, Mateusiak K, Sadowski B, Domański E. The effect of prolonged stress on the oestrous cycle and prolactin secretion in sheep. Anim Reprod Sci. 1984; 7(4): 333-342.

Przekop F, Mateusiak K, Stupnicka E, Romanowicz K, Domański E. Suppressive effect of beta-endorphin and naloxone on the secretion of cortisol under stress conditions in sheep. Exp Clin Endocrinol. 1990; 95(2): 210-216.

Przekop F, Tomaszewska D. Responses in the hypothalamic monoaminergic system activity in ewes to beta-endorphin, CRF and their antagonists. Acta Neurobiol Exp. 1996; 56(3): 807-817.

Rispoli LA, Nett TM. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. Anim Reprod Sci. 2005; 88(1-2): 57-74.

Rivalland ET, Tilbrook AJ, Turner AI, Iqbal J, Pompolo S, Clarke IJ. Projections to the preoptic area from the paraventricular nucleus, arcuate nucleus and the bed nucleus of the stria terminalis are unlikely to be involved in stress-induced suppression of GnRH secretion in sheep. Neuroendocrinology. 2006; 84(1): 1-13.

Seong JY, Jarry H, Kühnemuth S, Leonhardt S, Wuttke W, Kim K. Effect of GABAergic compounds on gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in the rat. Endocrinology. 1995; 136(6): 2587-2593.

Seong JY, Kang SS, Kam K, Han YG, Kwon HB, Ryu K, et al. Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor expression in the posterior mediobasal hypothalamus by steroid hormones: implication of GnRH neuronal activity. Brain Res Mol Brain Res. 1998; 53(1-2): 226-235.

Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. Nature. 1983; 304(5924): 345-347.

Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M et al. Variation in kisspeptin and RFamide-releated peptide (RFRP) expression and terminal

connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. Endocrinology. 2008; 149(11): 5770-5782.

Smith J T. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. Domest Anim Endocrinol. 2012; 43(2): 75-84.

Smith MJ, Jennes L. Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. Reproduction. 2001; 122(1): 1-10.

Stupnicki R, Madej A. Radioimmunoassay of LH in blood plasma of farm animals. Endocrinology. 1976; 68(1): 6-13.

Tanebe K, Nishijo H, Muraguchi A, Ono T. Effects of chronic stress on hypothalamic interleukin-1beta, interleukin-2, and gonadotrophin-releasing hormone gene expression in ovariectomized rats. J Neuroendocrinol. 2000; 12(1): 13-21.

Tomaszewska-Zaremba D, Mateusiak K, Przekop F. The Involvement of GABAA receptors in the control of GnRH and beta-endorphin release, and catecholaminergic activity in the preoptic area in anestrous ewes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2002; 110(7) : 336-42.

Tortonese DJ, Lincoln GA. Photoperiodic modulation of the dopaminergic control of pulsatile LH secretion in sheep. J Endocrinol. 1994; 143(1): 25-32.

Tortonese DJ. Interaction between hypothalamic dopaminergic and opioidergic systems in the photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in sheep. Endocrinology. 1999; 140(2): 750-757.

Traczyk W, Przekop, F. Methods of investigation of the function of the hypothalamus and hypophysis in chronic experiment in sheep. Acta Physiol Pol. 1963; 14: 217-226.

Turzillo AM, Nolan TE, Nett TM. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression in sheep: interaction of GnRH and estradiol. Endocrinology. 1998; 139(12): 4890-4994.

Walter JJ, Terry JR, Lightman SL. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Proc R Soc B 2010; 277(1688): 1627-1633.

Wang O. Glucocorticoids Regulate Kisspeptin Neurons during Stress and Contribute to Infertility and Obesity in Leptin-Deficient Mice. Doctoral dissertation, Harvard University. 2012; http://nrs.harvard.edu/urn-3:HUL.InstRepos:9453704

Whitelaw CM, Robinson JE, Hastie PM, Padmanabhan V, Evans NP. Effects of cycle stage on regionalised galanin, galanin receptors 1-3, GNRH and GNRH receptor mRNA expression in the ovine hypothalamus. J Endocrinol. 2012; 212(3): 353-361.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Publikacje przed doktoratem

1. Markowska M, Białecka B, **Ciechanowska M**, Koter Z, Laskowska H, Karkucińska-Więckowska A, et al. Effect of immunization on nocturnal NAT activity in chicken pineal gland. Neuroendocrinol Lett. 2000; 21(5): 367-373.

2. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski T, Misztal T, Mateusiak K, Przekop F. Effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the preoptic area-hypothalamus and GnRH-R gene in the stalk/median eminence and anterior pituitary gland in ewes during follicular phase of the estrous cycle. Acta Neurobiol Exp. 2007; 67(1): 1-12.

3. Łapot M, **Ciechanowska M**, Malewski T, Misztal T, Mateusiak K, Przekop F. The effect of stress on the expression of GnRH and GnRH receptor genes in the discrete regions of the hypothalamus and pituitary of anestrous ewes. Reprod Biol. 2007; 7(1): 55-71.

4. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski T, Misztal T, Mateusiak K, Przekop F. The central effect of beta-endorphin and naloxone on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus, and GnRH-R gene in the anterior pituitary gland in follicular phase ewes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008; 116(1): 40-46.

5. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Expression of the GnRH and GnRH receptor (GnRH-R) genes in the hypothalamus and of GnRH-R gene in the anterior pituitary gland of anestrous and luteal phase ewes. Anim Reprod Sci. 2008; 108(3-4): 345-355.

6. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Implication of dopaminergic systems on GnRH and GnRHR genes expression in the hypothalamus and GnRH-R gene expression in the anterior pituitary gland of anestrous ewes. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008; 116(6): 357-362.

7. Łapot M, **Ciechanowska M**, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Changes in the GnRH mRNA and GnRH receptor (GnRH-R) mRNA levels in the hypothalamic-anterior pituitary unit of anestrous ewes after infusion of GnRH into the third cerebral ventricle. Reprod Biol. 2008; 8(2): 149-161.

8. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Effect of GABAA receptor modulation on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus and GnRH-R gene in the anterior pituitary gland of follicular-phase ewes. Anim Reprod Sci. 2009; 111 (2-4): 235-248.

Publikacje po doktoracie

9. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski M, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Ekspresja genu GnRH i genu receptora GnRH (GnRHR) w układzie podwzgórzowo-

przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych. Postępy Nauk Rolniczych. 2010; 4: 91-103.

10. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski T, Mateusiak K, Przekop F. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. Reprod Biol. 2010; 10(2): 85-124.

11. **Ciechanowska M**, Łapot M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Effects of corticotropin-releasing hormone and its antagonist on the gene expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in the hypothalamus and anterior pituitary gland of follicular phase ewes. Reprod Fertil Dev. 2011; 23(6): 780-787.

12. Przekop F, **Ciechanowska M**. Kisspeptin (kiss 1) network signaling hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. J Animal Feed Sci. 2012; 21: 397-424.

13. **Ciechanowska M**, Misztal T, Przekop F. Prolactin and the physiological regulation of its secretion. J Animal Feed Sci. 2013; 22: 79-89.

14. Antkowiak B, Paluch M, **Ciechanowska M**, Nawrocka M, Bańkowski K, Michalak O, et al. Antinociceptive effect of d-Lys2, Dab4N-(ureidoethyl)amide, a new cyclic 1-4 dermorphin/deltorphin analog. Pharmacol Rep. 2014; 66 (4): 600-605.

15. Król T, Trybus W, Trybus E, Kopacz-Bednarska A, Kowalczyk M, Brytan M, Paluch M, Antkowiak B, Saracyn M, Król G, **Ciechanowska M**. Assessment of exogenous melatonin action on mouse liver cells after exposure to soman. Environ Toxicol Pharmacol. 2018; 64:147-154.

16. **Ciechanowska M**, Łapot M, Kowalczyk M, Malewski T, Brytan M, Antkowiak B, et al. Does kisspeptin participate in GABA-mediated modulation of GnRH and GnRH receptor biosynthesis in the hypothalamic-pituitary unit of follicular-phase ewes? Pharmacol Rep. 2019; doi: 10.1016/j.phare.2019.02.019 [ahead of print].

Początek mojej drogi naukowej sięga jeszcze okresu studiów, gdy jako studentka IV roku Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, wybrałam fizjologię zwierząt na przedmiot specjalizacji prowadzącej do uzyskania magisterium. Pracując w zespole kierowanym przez prof. Krystynę Skwarło-Sońta, zajmującym się badaniami funkcji szyszynki jako gruczołu regulującego procesy neuroimmunologiczne u ptaków, wykonałam część doświadczalną i następnie przygotowałam pracę magisterską z tego właśnie zakresu. Jeszcze jako studentka przedstawiłam w Zakładzie Fizjologii (wówczas - Zwierząt Kręgowych) kilka seminariów dla studentów i pracowników, które oprócz prezentacji wyników badań własnych, poświęciłam również zobrazowaniu moich dodatkowych zainteresowań naukowych. Wyniki swoich doświadczeń prezentowałam również

na II Ogólnopolskiej Konferencji poświęconej Immunologii Weterynaryjnej w Świnoujściu w maju 1997 roku, a w roku następnym na VII międzynarodowym sympozjum pt.: ” Molecular And Physiological Aspects Of Regulatory Processes Of The Organism " w Krakowie. Wkrótce po uzyskaniu dyplomu magistra, wyniki zawarte w mojej pracy magisterskiej weszły w skład publikacji, której jestem współautorką (**publikacja 1**).

Po ukończeniu studiów kontynuowałam działalność naukową współpracując z Zakładem Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN (IFiŻZ PAN) w Jabłonnie. Tam też, pod kierunkiem prof. Franciszka Przekopa przygotowałam rozprawę doktorską, pracując w zespole realizującym grant finansowany z funduszy Komitetu Badań Naukowych pt. „Ekspresja genu *GnRH* i genu receptora *GnRH* (*GnRH-R*) w podwzgórzu oraz genu *GnRH-R* w przysadce u owiec; wpływ czynników stresogennych”. Zanim doszło do zakończenia mego przewodu doktorskiego, odbyłam szereg kursów i szkoleń z zakresu metod stosowanych w biologii molekularnej. W trakcie realizacji projektu współpracowałam z Zakładem Biologii Molekularnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, a następnie z Pracownią Technik Molekularnych i Biometrycznych Instytutu i Muzeum Zoologii PAN, gdzie wykonałam analizy molekularne na potrzeby realizacji projektu. Mój dorobek naukowy z tego okresu ma charakter problemowy i jest związany z pogłębianiem zagadnień poświęconych regulacji procesów rozrodczych u owcy. Przeprowadzone w ramach projektu badania zaowocowały powstaniem 8 oryginalnych prac doświadczalnych, 2 prac przeglądowych i kilkunastu doniesień konferencyjnych prezentowanych przede wszystkim na konferencjach międzynarodowych. Jeśli chodzi o konferencje, w zdecydowanej większości był to udział czynny, połączony z ustną prezentacją wyników badań własnych oraz głosami w dyskusji.

Badania poświęcono w całości procesom zaangażowanym w kontrolę aktywności układu GnRH/LH na poziomie transkrypcji genów *GnRH* i *GnRHR* w układzie podwzgórzowo-przysadkowym, a mając na uwadze tylko nieliczne istniejące wyniki badań ekspresji genu *GnRH* w podwzgórzu owcy oraz brak informacji o ekspresji genu *GnRHR* w tej strukturze, prace miały charakter poznawczy. Znaczący dorobek naukowy tego okresu wniósł nowe, istotne szczegóły w rozwój neuroendokrynologii rozrodu. Wykazano, po raz pierwszy, obecność transkryptu dla receptora GnRH w podwzgórzu owcy oraz określono współzależności, jakie zachodzą pomiędzy poziomami mRNA GnRH i GnRHR w tej strukturze oraz mRNA GnRHR w przysadce, a uwalnianiem LH w różnych stanach fizjologicznych u tego gatunku (**publikacja 5**). W ramach prowadzonych badań dokonano

również kompleksowej oceny wpływu stresu fizycznego (footshock), krótkotrwałego i o przedłużonym działaniu, na pierwszy etap molekularnych procesów wiodących do biosyntezy GnRH i GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym. Wykazano, że zmiany w uwalnianiu GnRH/LH, wywołane działaniem stresora, mogą wynikać bezpośrednio z pobudzania lub hamowania transkrypcji genów *GnRH* i *GnRHR*, a odpowiedź organizmu na czynniki stresogenne w znacznej mierze zależy od czasu oddziaływania bodźca stresogennego i stanu fizjologicznego zwierzęcia, dowodząc tym samym, że status hormonalny organizmu jest niezwykle istotny dla przebiegu reakcji stresowej (**publikacja 2, publikacja 3**). W celu bardziej wnikliwej analizy neuroendokrynnej regulacji procesów rozrodczych oraz mechanizmów, poprzez które stres zakłóca sekrecję gonadotropin, w kolejnych badaniach analizowano wpływ infuzji β-endorfiny lub naloksonu (**publikacja 4**) oraz CRH lub CRH-A (**publikacja 11)** na poziomy transkryptów dla GnRH i GnRHR. Infuzje przeprowadzano w sposób pulsacyjny, przez cztery kolejne dni, tak aby naśladowały naturę czynników stresogennych o przedłużonym działaniu. Wykazano, że zarówno β-endorfina, jak i CRH obniżają poziomy mRNA dla GnRH w podwzgórzu i dla GnRHR w przysadce, lecz w różny sposób wpływają na ekspresję mRNA GnRHR w podwzgórzu, a obserwowany efekt zależał od analizowanego obszaru tej struktury. Brak wrażliwości układu GnRH/LH na nalokson, odnotowany w niniejszych badaniach, mógł wynikać z faktu, że zastosowana dawka naloksonu była zbyt niska, by skutecznie wyłączyć aktywność μ-opioidową. Ponadto w okresie poprzedzającym wylew gonadotropin, gdy dochodzi do fizjologicznego obniżenia aktywności układu β-endorfiny w podwzgórzu, działanie antagonisty receptora μ mogło być słabiej wyrażone.

Kolejną pracę poświęcono określeniu wpływu aktywacji i zablokowania receptorów GABA typu A ($GABA_A$) na aktywność transkrypcyjną genów *GnRH* i *GnRHR* w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego (**publikacja 8**). Hamowanie sekrecji gonadotropin w cyklu estralnym jest bowiem powiązane ze wzmożoną aktywnością neuronów GABA w podwzgórzu, a wpływ tego neurotransmitera na uwalnianie GnRH może być zróżnicowany i w znacznej mierze zależy od rodzaju aktywowanego receptora błonowego wiążącego GABA. Przeprowadzone w tym celu ośrodkowe infuzje agonisty (muscimol) oraz antagonisty (bikukulina) receptorów $GABA_A$ spowodowały odpowiednio obniżenie lub wzrost ekspresji mRNA kodującego zarówno ligand, jak i receptor w podwzgórzu oraz GnRHR w przysadce. Wzmożona aktywność neuronów dopaminy w odpowiedzi na ujemne sprzężenie zwrotne estradiolu, wywierane

na układ gonadotropowy w okresie anestralnym, skłoniła z kolei do analizy wpływu zablokowania receptora D2 na poziomy transkryptów GnRH i GnRHR u anestralnych owiec (**publikacja 6**). Uzyskane wyniki dowiodły, że układ dopaminy w podwzgórzu uczestniczy, nie tylko w kontroli uwalniania GnRH/LH, lecz także w regulacji ekspresji genów *GnRH* oraz *GnRHR*. Obniżona ekspresja mRNA GnRH w podwzgórzu, wywołana działaniem sulpirydu, wyraźnie wskazywała na wykorzystanie transkryptu w zintensyfikowanej biosyntezie GnRH, o czym świadczył podwyższony poziom transkryptu dla GnRHR w przysadce oraz zwiększona sekrecja LH.

Następne badania miały na celu określenie wpływu infuzji małych dawek egzogennego GnRH na ekspresję mRNA GnRH i GnRHR w układzie podwzgórzowo-przysadkowym anestralnych owiec. Istniały bowiem pewne sugestie wskazujące, że GnRH, działając parakrynowo, może uczestniczyć w regulacji własnego uwalniania, ale mechanizmy zaangażowane w ten proces pozostawały wciąż niewyjaśnione (**publikacja 7**). Nieliczne dane z piśmiennictwa wskazywały, że aktywacja GnRHR w obszarze podwzgórza brzuszno-przyśrodkowego przez analogi GnRH hamuje uwalnianie neurohormonu z zakończeń nerwowych w tej strukturze. Wyniki badań własnych dowiodły, że sugerowany mechanizm ultrakrótkiego sprzężenia zwrotnego może obejmować poziomy transkrypcji genów GnRH i GnRHR.

Za doroczne osiągnięcia w pracy naukowej dwukrotnie otrzymałam (w latach 2007, 2008) Nagrodę Naukową I stopnia w swoim miejscu zatrudnienia. Byłam także jednym z członków zespołu, którego prace w 2009 roku, zostały wyróżnione dyplomem uznania odpowiedniego wydziału PAN. Wraz z uzyskaniem tego wyróżnienia, jako członek uhonorowanego zespołu, zostałam zaproszona do przygotowania i publikacji pracy przeglądowej w języku polskim, poświeconej mechanizmom regulacji sekrecji gonadotropin w różnych stanach fizjologicznych (**publikacja 9**). Piśmiennictwo zebrane w czasie przygotowań do tego procesu, podobnie jak też niemały ciężar gatunkowy badań własnych, posłużyły do opracowania kolejnej publikacji przeglądowej, tym razem w języku angielskim, podsumowującej stan wiedzy związanej z mechanizmami neuroendokrynnymi regulacji procesów rozrodczych u owcy (**publikacja 10**). W ramach obowiązków asystenta, wyniki swych badań przedstawiłam na kilku seminariach dla pracowników IFiŻZ PAN w Jabłonnie oraz na dwóch Sympozjach Sprawozdawczych PAN w Jastrzębcu i w Olsztynie. Pod koniec pracy nad doktoratem przedstawiłam również seminarium w Zakładzie Fizjologii Zwierząt

Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, a moje wystąpienie było prezentacją i podsumowaniem wieloletniej pracy naukowej w IFiŻZ PAN w Jabłonnie.

Po obronie, z wyróżnieniem, rozprawy doktorskiej rozpoczęłam pracę w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii im. gen. Karola Kaczkowskiego (WIHiE) w Warszawie. Zakład Farmakologii i Toksykologii prowadzi wieloletnie badania na rzecz obronności kraju i bezpieczeństwa międzynarodowego mające na celu, między innymi, optymalizację indywidualnego, ale też szerzej pojętego, zabezpieczenia medycznego przed wysokotoksycznymi czynnikami chemicznymi na współczesnym polu walki. Taki też jest obecny zakres mych obowiązków, a moja działalność naukowa w nowym miejscu pracy została zainspirowana przez prof. Marka Kowalczyka. Od początku pracy w Instytucie włączyłam się w realizację zadań badawczych w ramach trzech prowadzonych w Zakładzie projektów: (1) finansowanego przez Ministerstwo Obrony Narodowej projektu pt. „Zabezpieczenie medyczne Sił Zbrojnych RP przed skutkami działania czynników wojny chemicznej", (2) finansowanego z funduszy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pt. „Żołnierz jako broń precyzyjna - pakiety i zestawy" oraz (3) realizowanego w międzynarodowym konsorcjum, finansowanego z zasobów Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Programu FP7-SECURITY pt. "PRecursors of ExplosiVes: Additives to inhibit their use including Liquids".

Realizacja dwóch pierwszych projektów objęła szeroko zakrojone badania poświęcone różnym aspektom poprawy i uzupełnienia zabezpieczenia medycznego, które w sposób skuteczny, zgodny z aktualnym stanem wiedzy i standardami międzynarodowymi zapewniłoby odpowiednią ochronę żołnierzy przed bronią chemiczną. Wagę trzeciego przedsięwzięcia podkreśla fakt, że Komisja Europejska wskazała na kontynuowanie badań, a konsekwencją tej decyzji był kolejny projekt WIHiE z moim udziałem pt. "EXPEDIA EXplosives PrEcursors Defeat by Ihibition Additives". Nie bez znaczenia dla takiej decyzji były tragiczne wydarzenia na wyspie Utoya w Norwegii, które miały miejsce w 2011 roku. Na potrzeby realizowanych zadań badawczych, wraz z kierowanym przeze mnie zespołem Pracowni Toksykologii, wykonałam istotne ekspertyzy analityczne. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że analizy te zostały wykonane wyłącznie w Pracowni Toksykologii WIHiE. Moja zasługa jest taka, że zorganizowałam tę Pracownię *de novo*, wyposażając ją, dzięki funduszom projektu własnego otrzymanego w 2012 roku, w aparaturę niezbędną do analiz z wykorzystaniem technik biologii molekularnej. To uznaję za osobisty sukces, zwłaszcza że przeprowadzone w ramach projektów badania mają duży potencjał aplikacyjny w różnych

gałęziach przemysłu, a proponowane rozwiązania mogą być skuteczne, o ile staną się priorytetami, w zniwelowaniu ryzyka działań ludzkich, które mogłyby doprowadzić do podobnej tragedii.

Mimo absorbującego układu doświadczeń w nowym miejscu pracy, nadal pozostałam wierna swojej największej pasji naukowej, która niegdyś została we mnie zaszczepiona. Przygotowując się do stworzenia projektu własnego, zebrałam dane z piśmiennictwa, które pozwoliły na sformułowanie kolejnej pracy przeglądowej. Pracę tę w całości poświęcono kisspeptynie - nowemu peptydowi regulacyjnemu na „scenie" neuroendokrynologii rozrodu (**publikacja 12**). Opisano neuroanatomiczną organizację układu kisspeptyny w podwzgórzu oraz wielokierunkowość oddziaływań tego neuropeptydu, w tym jego rolę w przekazywaniu informacji metabolicznej do układu gonadotropowego. Scharakteryzowano także procesy leżące u podstaw aktywacji neuronów GnRH przez Kiss 1 w okresie dojrzewania. Przybliżono również mechanizmy działania steroidów płciowych gonad na ekspresję genu kodującego *Kiss 1* w podwzgórzu szczura we wczesnym okresie postnatalnym oraz pośrednią rolę neuronów Kiss 1 we wpływie fotoperiodu i sygnałów metabolicznych na aktywność osi HPG u gatunków o sezonowym charakterze rozrodu. We współpracy z Zakładem Endokrynologii IFiŻZ PAN w Jabłonnie powstała jeszcze jedna praca przeglądowa, tym razem dedykowana prolaktynie i mechanizmom fizjologicznym biosyntezy/uwalniania tego hormonu (**publikacja 13**). Scharakteryzowano w niej różne postaci i/lub kompleksy prolaktyny, lecz przede wszystkim opisano mnogość czynników pobudzających i hamujących jej sekrecję.

Po uzyskaniu stopnia doktora wykonałam pięć recenzji prac naukowych; były to recenzje artykułów dla czasopism z listy filadelfijskiej: Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes (2) oraz Reproduction, Fertility and Development (3).

Zanim doszło do sfinalizowania projektu własnego, założenia badań proponowanych w ramach jego realizacji, przynajmniej częściowe, przedstawiłam na Sesji Farmakologii XIV Warszawskich Dni Kardiologii Akademickiej, zorganizowanej w 2012 roku przez Polskie Towarzystwo Farmakologii. Co ważne, zyskały one powszechną aprobatę. Osiągnięcia prac związanych z grantem własnym prezentowałam również w 2015 oraz w 2017 roku na XII i XIII Międzynarodowym Kongresie Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego w Gdańsku i Warszawie (łącznie 5 doniesień). Co istotne, w obydwu przypadkach zostały one opublikowane w suplementach czasopisma Acta Neurobiologiae Experimentalis. Poznanie mechanizmów molekularnych regulujących ekspresję genów

kodujących składowe osi podwzgórzowo-przysadkowej wydawało się niezbędne do zrozumienia fizjologii i patologii rozmnażania, a kolejne badania własne, które wpisały się w najnowszy nurt poszukiwań w tej dziedzinie, dotyczyły roli neuroprzekaźnika GABA (**publikacja 16**). Uzyskane wyniki podkreśliły znaczenie receptorów $GABA_A$ w regulacji sekrecji GnRH/LH, dowodząc, że hamowanie uwalniania GnRH/LH przez GABA u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego zachodzi na poziomie procesów molekularnych wiodących do biosyntezy GnRH i GnRHR w podwzgórzu oraz GnRHR w przysadce. Brak zmian w ekspresji mRNA Kiss 1 i Kiss1r w podwzgórzu owiec poddanych infuzjom muscimolu i bikukuliny, wykazany w niniejszych badaniach, może sugerować, że mechanizm, poprzez który GABA obniża biosyntezę GnRH i GnRHR, wyklucza pośredniczenie neuronów Kiss 1 w podwzgórzu.

Ze względu na specyfikę prac prowadzonych w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii WIHiE, tylko nieznaczna część moich publikacji wykracza poza zagadnienia neuroendokrynologii. W ramach współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Wydziałem Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz z Wydziałem Rehabilitacji Akademii Wychowania Fizycznego (AWF) w Warszawie, brałam udział w zadaniach badawczych, których celem było opracowanie zamiennika morfiny - nowego, skutecznego i bezpiecznego leku do zastosowania w terapii zespołów bólowych, zarówno ostrych, jak i przewlekłych (**publikacja 14**). Obecnie zajmuję się badaniem mechanizmów komórkowych i molekularnych ostrych zatruć i opóźnionych schorzeń powodowanych przez bojowe środki trujące (BST) z grupy związków fosforoorganicznych oraz poszukiwaniem efektywnych zabezpieczeń przed szkodliwym działaniem tych wysokotoksycznych substancji. Te działania poszukiwawcze ponownie skierowały moje zainteresowania w stronę cząsteczki o wszechstronnych właściwościach, czyli w stronę melatoniny. Ważnym osiągnięciem tych badań była prezentacja ich wyników na XIX Międzynarodowym Kongresie Polskiego Towarzystwa Farmakologii w Świnoujściu (jedno doniesienie) oraz na XIII Międzynarodowym Kongresie Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego w Warszawie (2 doniesienia). Wagę uczestnictwa w tych konferencjach podkreśla fakt, że wszystkie streszczenia opublikowano w suplementach czasopism posiadających współczynnik impact factor (Pharmacological Reports i Acta Neurobiologiae Experimentalis). Kolejnym wymiernym efektem tych badań, prowadzonych tym razem we współpracy z Zakładem Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej, Instytutu Biologii Uniwersytetu im. Jana Kochanowskiego w Kielcach, AWF w Warszawie i Wojskowym

Instytutem Medycznym, jest publikacja poświęcona ochronnej roli melatoniny pełnionej względem komórek wątroby myszy w warunkach narażenia na BST. To protekcyjne działanie melatoniny wynika z jej właściwości antywolnorodnikowych oraz zdolności do aktywacji układu lizosomalnego w hepatocytach (**publikacja 15**).

Dominującym obszarem mojej obecnej pracy naukowo-badawczej jest analiza molekularnych mechanizmów zaburzeń aktywności sekrecyjnej hormonów układu HPG w przebiegu zatruć wysokotoksycznymi związkami fosforoorganicznymi oraz ocena ochronnego potencjału melatoniny w zapobieganiu negatywnym skutkom działania tych szczególnie niebezpiecznych związków. Te, łączące moje wszystkie dotychczasowe zainteresowania, badania, na które uzyskałam już stosowne zezwolenie Komisji Etycznej, są obecnie w toku realizacji.

Moja bieżąca aktywność naukowa jest również związana z wykonywaniem zadań w ramach aktualnie realizowanych przez WIHiE projektów, w tym dwóch finansowanych przez Ministerstwo Obrony Narodowej w ramach Narodowego Programu Zdrowia pt. (1) „Ocena wpływu ekspozycji na czynniki chemiczne, biologiczne i fizyczne wynikające ze specyfiki służby żołnierzy zawodowych, z wyłączeniem lotnictwa wojskowego i Marynarki Wojennej" oraz (2) „Wpływ uwarunkowań otoczenia wynikający ze specyfiki życia żołnierzy zawodowych Marynarki Wojennej (z wyłączeniem lotnictwa wojskowego), funkcjonariuszy służb mundurowych i ich rodzin". Głównym nurtem tych działań jest weryfikacja i uzupełnienie już istniejących danych oraz stworzenie nowej klasyfikacji komponentów uwarunkowań otoczenia i katalogu specyficznych zagrożeń w środowisku służby i zamieszkania. Do ważnych osiągnięć obecnej działalności naukowo-badawczej zaliczam również swój udział, na zasadzie współwykonawstwa, w projekcie badawczym finansowanym z funduszy Narodowego Centrum Badań i Rozwoju pt. „Homeostatyczne, resorbowalne opatrunki podwójnego zastosowania", w którym realizowane przeze mnie zadania obejmują w szczególności ocenę toksycznego, genotoksycznego i rakotwórczego działania wywieranego na organizm przez poszczególne elementy nowo tworzonego opatrunku.

Ostatnim, nieco odrębnym, wątkiem moich zainteresowań jest udział w projekcie pt. "Strengthening chemical and biological waste management in Central Asia countries for improved security and safety risk mitigation". Jednak idea tego przedsięwzięcia, dedykowana poprawie bezpieczeństwa gospodarowania odpadami chemicznymi i biologicznymi w krajach Azji Środkowej ma swe, nie błahe, lecz istotne atuty.

Magdalena Ciechanowska