

## STRESZCZENIE

Początek współczesnej ery badań nad równowagą energetyczną ustroju, datuje się od odkrycia białek zaangażowanych w regulację przyjmowania pokarmu, działających w obrębie CNS oraz hormonów produkowanych w żołądku, tkance tłuszczowej i w innych narządach peryferycznych, które na drodze pośrednich oddziaływań wpływają na aktywność ośrodków nerwowych koordynujących procesami związanymi z metabolizmem, rozrodem i wzrostem. Jednakże prawdziwym przełomem w ciągu ostatniego dwudziestolecia było zidentyfikowanie leptyny - hormonu informującego CNS o zapasach energetycznych zgromadzonych w tkance tłuszczowej, który wpływa na metabolizm wielotorowo, w tym jak potwierdzają badania prezentowane w niniejszej pracy poprzez modulację wydzielania innych wskaźników homeostazy energetycznej, tj. oreksyny A i B, greliny oraz kształtowania ich wpływu na aktywność osi gonado- i somatotropowej.

Aktualny stan wiedzy na temat interakcji zachodzących pomiędzy leptyną a powyższymi białkami w kontekście silnego wpływu fotoperiodu nie jest satysfakcjonujący i dotyczy głównie badań przeprowadzonych na gryzoniach. Jednak ze względu na ściśle przystosowanie do warunków środowiska, związane z plastycznością układu endokrynnego, a także występowanie fizjologicznego zjawiska leptynooporności, owce mogą stanowić bardziej interesujący model do tego typu badań. Dodatkowo analizowana w niniejszej pracy neuroendokrynną zależność pomiędzy leptyną a innymi hormonami metabolicznymi (oreksyną A i B, greliną, hormonem wzrostu) i hormonem luteinizującym w okresie fizjologicznej wrażliwości i oporności na działanie tej adipokiny, może wnieść nową wartość poznawczą dotyczącą tego zjawiska u owiec.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy zostały podzielone na dwie główne części, obejmujące zagadnienia dotyczące wspólnego tematu, jakim jest oddziaływanie fotoperiodu na interakcje zachodzące pomiędzy wybranymi hormonami zaangażowanymi w regulację homeostazy energetycznej u owiec. Pierwsza z części obejmowała doświadczenia przeprowadzone w warunkach *in vivo* i *in vitro*, które miały na celu określenie wzajemnych relacji pomiędzy leptyną, oreksyną B i greliną, a także wyjaśnienie roli warunków świetlnych w kształtowaniu powyższych zależności. Badania w warunkach *in vivo* wykonano w oparciu o dokomorowe infuzje czynników doświadczalnych: leptyny, oreksyny B, greliny oraz kombinacji antagonisty receptora leptyny (SOLA) z oreksyną B lub greliną. Natomiast badania *in vitro* polegały na 4-godzinnych inkubacjach eksplantów szyszynki w pożywce hodowlanej z dodatkiem leptyny, oreksyny B, greliny lub antagonisty receptora leptyny (SLAN-3) z leptyną, a także leptyny w połączeniu z oreksyną

B bądź greliną. W obu modelach doświadczalnych dodatkowo analizie poddano wpływ różnych dawek czynników doświadczalnych oraz zmieniającej się pory roku na uwalnianie badanych białek do krwi lub pożywki hodowlanej.

Doświadczenia składające się na drugą część niniejszej pracy dotyczyły indywidualnego wpływu leptyny, oreksyny A i greliny na aktywność osi gonado- i somatotropowej, jak również prześledzenia roli leptyny i sezonu rozrodczego owiec w kształtowaniu się powyższych zależności. Podobnie jak w pierwszej części, badania przeprowadzono wykorzystując technikę dokomorowych infuzji oraz hodowli tkankowej (inkubacji eksplantów przysadek gruczołowych). Analizowano stężenie endogennego GH i LH w osoczu krwi oraz pożywce w warunkach zmieniającej się długości dnia (badania *in vivo* i *in vitro*) oraz różnego statusu energetycznego (badania *in vitro*).

Wyniki uzyskane w części pierwszej wskazały na istotną rolę leptyny, jako czynnika modulującego kierunek wzajemnych zależności pomiędzy oreksyną B i greliną oraz aktywność wydzielniczą szyszynki. Hamujący wpływ leptyny na wydzielanie oreksyny B i greliny został potwierdzony zarówno w wyniku indywidualnego działania leptyny, jak również kombinacji SOLA z oreksyną B lub greliną. Infundowana dokomorowo leptyna dawko-zależnie znacznie mocniej obniżyła stężenie badanych hormonów w osoczu krwi podczas dnia krótkiego w porównaniu z dniem długim. Zastosowanie SOLA wzmocniło stymulujący wpływ oreksyny B na uwalnianie greliny do krwi, podobnie jak nasiliło dodatni wpływ greliny na sekrecję oreksyny B, w sposób niezależny od długości dnia.

Egzogenna leptyna, oreksyna B lub grelina w sposób dawko-zależny odpowiadały za zmiany w wydzielaniu melatoniny do krwi i pożywki hodowlanej, a pora roku modyfikowała charakter tych oddziaływań. Stymulowany leptyną wzrost uwalniania badanego hormonu do krwi obserwowano jedynie w okresie dnia krótkiego, podczas gdy podobne działanie oreksyny B i greliny zaznaczało się w okresie dnia długiego. Suplementacja pożywki hodowlanej leptyną lub oreksyną B odpowiadały za zbliżone zmiany w wydzielaniu melatoniny obserwowane wcześniej w badaniach *in vivo*. Natomiast w przypadku greliny odnotowano jej hamujący wpływ na uwalnianie melatoniny do pożywki podczas dnia krótkiego oraz brak wpływu podczas dnia długiego. Interakcje zachodzące pomiędzy leptyną a oreksyną B lub greliną miały swoje konsekwencje w postaci zmian w stężeniu melatoniny w pożywce hodowlanej, które były uzależnione od pory roku i stosowanych dawek hormonów.

W drugiej części pracy wykazano, że aplikacja leptyny lub oreksyny A do III komory mózgu oraz ich dodatek do podłoża hodowlanego istotnie zwiększyły wydzielanie



LH podczas dnia krótkiego w porównaniu z dniem długim. Podobny efekt obserwowano po dokomorowych infuzjach greliny. W odniesieniu do GH stwierdzono niezależny od pory roku wzrost jego stężenia w osoczu krwi na skutek działania greliny oraz wzrost jego wydzielania w okresie wiosenno – letnim pod wpływem oreksyny A. Egzogenna leptyna hamowała uwalnianie GH do krwi w okresie wydłużających się dni. Suplementacja pożywki hodowlanej greliną lub leptyną modulowała uwalnianie GH w zależności od warunków świetlnych oraz statusu żywieniowego owiec. Badania przeprowadzone z udziałem SOLA lub SLAN-3 potwierdziły istotny wpływ leptyny na aktywność greliny i oreksyny A względem osi gonado- i somatotropowej, który dodatkowo w części doświadczeń *in vitro* była modyfikowana przez status żywieniowy.

Na podstawie przeprowadzonych badań nasuwają się wnioski, że pomiędzy leptyną a oreksyną A i B oraz greliną istnieje silna sieć wzajemnych zależności. Wymienione hormony regulują na drodze bezpośrednich lub pośrednich oddziaływań wydzielanie melatoniny, jak również GH i LH. Wskazuje to na ich aktywność endokrynną, która jest dodatkowo modulowana przez działanie fotoperiodu lub statusu żywieniowego u zwierząt sezonowych.

## SUMMARY

The beginning of the modern era of research on energy homeostasis dates from the discovery of proteins engaged in the regulation of food intake, acting within CNS and hormones produced in the stomach, in adipose tissue and other peripheral organs which, through indirect interactions, affect the activity of nervous centres that coordinate processes related to metabolism, reproduction and growth. However, a true breakthrough during the last twenty years was the identification of leptin, which is a hormone that informs CNS about energy supplies contained in adipose tissue, which affects metabolism in multiple ways. This is confirmed by the research presented in this thesis, and manifests itself through the modulation of secretion of other energy homeostasis indicators, i.e. orexin A and B, ghrelin as well as through the formation of their influence on the activity of gonadotropic and somatotropic axes.

The current state of knowledge with regard to the interactions between leptin and the above-noted proteins, in the context of a strong influence of photoperiod, is not satisfactory, and it is concerned mainly with research carried out on rodents. However, because of their similar adaptation to environmental conditions and their association with a plasticity of the endocrine system, as well as occurrence of physiological leptin resistance,

sheep can serve as more interesting models for such research. As also analyzed in this thesis, neuroendocrine dependence between leptin and other metabolic hormones (orexin A and B, ghrelin, growth hormone) and luteinizing hormones during the period of physiological sensitivity and resistance to effects of this adipokine can bring about a new cognitive value with regard to this phenomenon.

Research carried out within this thesis has been divided into two main parts covering issues with regard to a common theme, that being the impact of photoperiod on interaction between the selected hormones which are engaged in regulation of energy homeostasis in sheep. The first part contained experiments carried out in *in vivo* and *in vitro* conditions. The purpose of such experiments was to determine mutual relationships between leptin, orexin B and ghrelin, as well as to clarify the role of light conditions information of the above-noted relationships. The experiments in *in vivo* conditions were carried out based on intracerebroventricular infusions of the following experimental development factors: leptin, orexin B, ghrelin and combinations of the leptin (SOLA) receptor antagonist with orexin or ghrelin, whereas *in vitro* experiments relied on four-hour incubations of pineal explants in a culture medium with added leptin, orexin B, ghrelin or leptin receptor antagonist (SLAN-3) with leptin, and also leptin in combination with orexin B or ghrelin. In both models of experimental development there were additional analyses of the effects of different doses of such experimental development factors and seasonal changes on the release of tested proteins into the bloodstream or the culture medium.

Experiments which comprised the second part of this paper concerned the individual influence of leptin, orexin A and ghrelin on the activity of gonadotropic and somatotropic axes, as well as investigation of the role of leptin and the breeding season of sheep in the shaping of the above-noted relationships. As with the first part, research was carried out by utilizing intraventricular infusions and tissue culture (incubation of the pituitary gland explants). A concentration of endogenous GH and LH in blood plasma and in a medium was analyzed, under conditions of the changing daylight length (*in vivo* and *in vitro* experiments) and differing energy status (*in vitro* experiments).

Results achieved in the first part of the paper indicated the significant role of leptin as a factor modulating the direction of mutual dependence between orexin B and ghrelin as well as pineal secretory activity. The inhibitory effect of leptin on orexin B and ghrelin secretion was confirmed, as a result of both the individual acting of leptin as well as the combination of SOLA with orexin B or ghrelin. Intracerebroventricular infusion of leptin, depending on the dose, lowered the concentration of examined hormones in blood plasma more significantly



during the shorter days, as compared to the longer days. The application of SOLA strengthened the stimulating effects of orexin B on the release of ghrelin into the bloodstream. Similarly, there was an increase of the positive effect of ghrelin on orexin B secretion, independently from the daylight length.

Exogenous leptin, orexin B or ghrelin, depending on the dose, were responsible for the changes in secretion of melatonin into the bloodstream and culture medium, and the particular season modified the nature of these effects. As stimulated by leptin, an increased release of tested hormones into the bloodstream was observed only during the shorter daylight, while a similar effect of orexin B and ghrelin showed up during the longer daylight period. The supplementation of a culture medium with leptin or orexin B accounted for similar changes in melatonin secretion, as observed earlier in *in vivo* experiments, whereas, in the case of ghrelin there was a noted inhibitory effect on the release of melatonin into the culture medium during the shorter days and a lack of such effect during the longer days. Interactions taking place between leptin and orexin B or ghrelin resulted in changes in the concentration of melatonin in the culture medium, which were dependent on the particular season and used doses of hormones.

In the second part of the thesis, it was demonstrated that the application of leptin or orexin A to a cerebral chamber III and their addition to a culture medium significantly increased LH secretion during the shorter days as compared to the longer days. A similar resulting effect was observed after intracerebroventricular infusions of ghrelin. With respect to GH, it was stated that, independent from a particular season, there was an increase of GH concentration in the blood plasma as a result of ghrelin interaction as well as an increased GH secretion during the Spring/Summer period and under the influence of orexin A. Exogenous leptin inhibited the release of GH into the bloodstream during the period of increasing daylight. The supplementation of a culture medium with ghrelin or leptin modulated the release of GH, dependent on light conditions and the nutritional status of the sheep. Research carried out using SOLA or SLAN-3 confirmed the significant influence of leptin on ghrelin and orexin A effect in terms of gonadotropic and somatotropic axes. Also, such impact was additionally modified by the nutritional status in the part with the *in vitro* research.

Based on this research, conclusions arise as to the existence of a strong network of mutual dependence between leptin and orexin A and B, as well as ghrelin. The above-listed hormones regulate, by direct or indirect influence, the secretion of melatonin and also of GH and LH. This indicates their endocrine activity, which is additionally modulated by the photoperiod effect or by the nutritional status amongst seasonal animals.

*Katarzyna Kwin*