

**Wpływ diety kafeteryjnej matki na układ  
immunologiczny, profil metaboliczny i hormonalny  
oraz funkcje rozrodcze potomstwa szczurów**

**Mgr Julia Matuszewska**

**Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze**

**Dyscyplina: Nauki biologiczne**

**Promotor: Prof. dr hab. Joanna H. Śliwowska**

**Drugi promotor: Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agata Chmurzyńska**

**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

**Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach**

**Katedra Zoologii**

**Pracownia Neurobiologii**

**Poznań 2023**

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojej Promotorce – Pani Profesor Joannie Śliwowskiej za wsparcie, zaangażowanie, cenne uwagi merytoryczne, wyrozumiałość oraz pomoc naukową podczas pisania niniejszej pracy.

Składam również podziękowania Pani Profesor Agacie Chmurzyńskiej za profesjonalizm, merytoryczne wsparcie w prowadzeniu eksperymentów oraz pomoc w przygotowaniu niniejszej rozprawy.

Dziękuję wszystkim Pracownikom Katedry Zoologii, Katedry Żywienia Człowieka i Dietetyki, Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt oraz Katedry Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu zaangażowanych w realizację niniejszej rozprawy doktorskiej.

Również dziękuję Panu dr Tomaszowi Zalewskiemu za cierpliwość i długie godziny spędzone przy pomiarach MRI.

Pragnę podziękować mojej rodzinie za nieocenione wsparcie, wyrozumiałość, dobre słowo – za wszystko.

## Wykaz artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

**Julia Matuszewska**, Tomasz Zalewski, Adam Klimaszyk, Kamil Ziarniak, Stefan Jurga, Agata Chmurzyńska, Joanna H. Śliwowska

Mothers' cafeteria diet induced sex-specific changes in fat content, metabolic profiles, and inflammation outcomes in rat offspring. *Sci Rep* 11, 18573 (2021).

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-97487-x>

(2 letni IF= 4,996; 5 letni IF= 5,133; pkt MNiSW= 140)

**Julia Matuszewska**, Joanna Nowacka-Woszek, Anna Radziejewska, Emilia Grzęda, Ewa Pruszyńska-Oszmałek, Łukasz Dylewski, Agata Chmurzyńska, Joanna H. Śliwowska

Maternal cafeteria diet influences Kiss1, Gpr54 and Sirt1 genes, hormonal, metabolic profiles and reproductive functions in rat offspring in sex-specific manner. *Biology of Reproduction*, 2023;, ioad101, <https://doi.org/10.1093/biolre/ioad101>

(2 letni IF= 3,6; 5 letni IF= 4,2; pkt MNiSW=200)

## **Źródła finansowania**

Grant NCN Preludium pt. „Wpływ diety kafeteryjnej matki na funkcje metaboliczne i rozrodcze potomstwa szczurów: w poszukiwaniu mechanizmu”, projekt rozpoczęty w 2020r., nr UMO-2019/35/N/NZ9/00663

Dofinansowanie zadania badawczego dla Młodych Naukowców na projekt pt. „Wpływ diety kafeteryjnej szczurzyce na profil cytokin pro- i przeciwzapalnych w tkankach obwodowych oraz mózgu u matek i ich potomstwa”, 2019 rok, nr 506-511-09-00

Dofinansowanie zadania badawczego dla Młodych Naukowców na projekt pt. „Wpływ diety kafeteryjnej szczurzyce na rozwój zaburzeń metabolicznych i rozkład tkanki tłuszczowej u potomstwa”, 2020 rok, nr 506-511-09-00

## Spis treści

Wykaz skrótów: .....	9
Streszczenie w języku polskim .....	12
Summary in English.....	16
I Wstęp.....	20
1. Otyłość – choroba cywilizacyjna .....	20
2. Programowanie prenatalne .....	20
3. Modele zwierzęcej otyłości z wyróżnieniem modelu ekspozycji na dietę kafeteryjną (KAF) .....	21
4. Model zwierzęcy wywoływania otyłości u potomstwa poprzez ekspozycję matek w okresie ciąży i/lub laktacji na KAF .....	22
4.1. KAF podawana matkom w okresie ciąży i/lub laktacji zmienia parametry metaboliczne potomstwa .....	22
4.2. Dieta KAF matki wywołuje proces zapalny u potomstwa .....	23
5. Oś podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady (PPG) i regulacja jej działania .....	24
5.1. Zaburzenia dojrzewania i rozmnażania potomstwa.....	28
II HIPOTEZY I CELE .....	33
III MATERIAŁY I METODY .....	34
3.1. Przebieg eksperymentu 1 .....	34
3.1.1. Dieta kafeteryjna (KAF).....	35
3.1.2. Badanie składu ciała „matek” szczurzych .....	36
3.1.3. Badanie z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI) .....	36
3.1.4. Potomstwo .....	37
3.1.5. Pobieranie materiału .....	37
3.1.6. Ocena profilu metabolicznego potomstwa .....	38
3.1.7. Ocena profilu immunologicznego potomstwa.....	38

3.1.8. Analiza poziomu transkryptu <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> , <i>Tac2</i> , <i>Pdyn</i> oraz <i>Sirt1</i> w podwzgórzu oraz <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> i <i>Sirt1</i> w wątrobie potomstwa .....	38
3.1.9. Analiza statystyczna .....	39
3.2. Przebieg eksperymentu 2 .....	40
3.2.1. Dieta kafeteryjna (KAF).....	41
3.2.2. Badanie składu ciała „matek” szczurzych .....	41
3.2.3. Potomstwo .....	41
3.2.4. Badanie składu ciała .....	41
3.2.5. Pobieranie materiału.....	42
3.2.6. Ocena profilu metabolicznego i hormonalnego potomstwa .....	42
3.2.7. Analiza poziomu transkryptu <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> , <i>Tac2</i> , <i>Pdyn</i> oraz <i>Sirt1</i> w podwzgórzu oraz <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> i <i>Sirt1</i> w wątrobie potomstwa.....	43
3.2.8. Analiza statystyczna .....	44
IV WYNIKI.....	45
4.1. Eksperyment 1.....	45
4.1.1. Matki: masa ciała, spożycie pokarmu i zawartość tkanki tłuszczowej .....	45
4.1.2. Wpływ KAF na objętość między łąpkowej tkanki tłuszczowej – badanie przy pomocy MRI.....	47
4.1.3. Badanie masy i składu ciała potomstwa .....	48
4.1.4. KAF matki w sposób płciowo-zależny wpływa na parametry metaboliczne potomstwa w 25 dniu po urodzeniu.....	51
4.1.5. KAF matki powoduje zależne od płci zmiany w profilu immunologicznym potomstwa w PND 25.....	53
4.1.6. KAF matki w płciowo-zależny sposób wpływa na poziom transkryptu dla <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> , <i>Sirt1</i> , <i>Pdyn</i> oraz <i>Tac2</i> w podwzgórzu potomstwa.....	55
4.1.7. KAF matki wpływa w płciowo-zależny sposób na poziom transkryptu dla <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> oraz <i>Sirt1</i> w wątrobie potomstwa.....	57
4.2. Eksperyment 2.....	59
4.2.1. Matki.....	59

4.2.2. Dane rozwojowe - potomstwo.....	62
4.2.3. Długotrwała ekspozycja na KAF matek powoduje płciowo-zależne zmiany składu ciała potomstwa.....	64
4.2.4. Długotrwała ekspozycja na KAF matki powoduje płciowo-zależne zmiany w profilu metabolicznym potomstwa.....	66
4.2.5. Analiza wpływu długoterminowej ekspozycji na KAF matki na profil hormonalny potomstwa.....	69
4.2.6. Długotrwała ekspozycja na KAF matki powoduje opóźnienie rozwarcia pochwy u samic.....	70
4.2.7. Długoterminowa ekspozycja na KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> oraz <i>Sirt1</i> oraz stosunku <i>Sirt1/Kiss1</i> w podwzgórzu potomstwa.....	71
4.2.8. Długoterminowa ekspozycja na KAF matki nie wpływa na poziom mRNA dla <i>Pdyn</i> oraz <i>Tac2</i> w podwzgórzu samic i samców.....	73
4.2.9. Długoterminowa ekspozycja na KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla <i>Kiss1</i> , <i>Gpr54</i> oraz <i>Sirt1</i> w wątrobie samic i samców. Zmiany te są bardziej widoczne u samców.....	74
4.3. Wykaz analiz przeprowadzonych samodzielnie przez Doktorantkę oraz przy współpracy z innymi naukowcami.....	76
V Dyskusja.....	78
5.1. Eksperyment 1.....	78
5.1.1. KAF matki ma wpływ na płciowo-zależne obniżenie masy ciała i procentowy wzrost zawartości tkanki tłuszczowej potomstwa.....	78
5.1.2. KAF matki zmienia w zależności od płci sposób profil metaboliczny potomstwa.....	80
5.1.3. KAF matki wywołuje stan zapalny u potomstwa, zmieniając profil immunologiczny, a samice są bardziej wrażliwe na te zmiany.....	81
5.1.4. KAF matki prowadzi do obniżenia poziomu transkryptu dla <i>Kiss1</i> tylko u samców, ale nie ma wpływu na poziom <i>Gpr54</i> , <i>Sirt1</i> , <i>Pdyn</i> oraz <i>Tac2</i> mRNA w podwzgórzu potomstwa.....	82

5.1.5. Ekspozycja na KAF matki prowadzi do płciowo-specyficznych zmian w poziomach transkryptu dla <i>Kiss1</i> i <i>Sirt1</i> , ale nie w <i>Gpr54</i> , w wątrobie potomstwa.....	83
5.2. Eksperyment 2.....	85
5.2.1. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF obniża masę ciała, ale nie wpływa na skład ciała potomstwa .....	85
5.2.2. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF wpływa w płciowo-specyficzny sposób na profil metaboliczny i hormonalny potomstwa.....	86
5.2.3. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF prowadzi do zależnych od płci zmian w profilu hormonalnym potomstwa.....	87
5.2.4. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF prowadzi do opóźnionego dojrzewania płciowego samic oraz upośledzenia funkcji rozrodczych u potomstwa samców. Zmiany te mogą przynajmniej częściowo wynikać z zakłócenia proporcji mRNA dla <i>Kiss1/Sirt1</i> w podwzgórzu u potomstwa KAF w porównaniu z K. ....	88
5.2.5. Długotrwała ekspozycja na KAF matki nie wpływa na poziom mRNA dla <i>Pdyn</i> oraz <i>Tac2</i> w podwzgórzu potomstwa.....	91
5.2.6. Długotrwała ekspozycja na KAF matki w płciowo-specyficzny sposób wpływa na zmiany w poziomie mRNA dla <i>Kiss1</i> oraz <i>Sirt1</i> w wątrobie potomstwa.....	92
VI Podsumowanie i wnioski .....	95
VII Literatura .....	96



## Wykaz skrótów:

ARC – jądro łukowate

AVPV – jądro przednio-brzuszo przyśrodkowe

BMI – wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)

cDNA – komplementarny DNA

DYN A – dynorfina A

E<sub>2</sub> – estradiol

EED – represor promotora *Kiss1*

EZH2 – enzym metylotransferaza

F1 – pierwsze pokolenie potomne

FSEMs – szybkie echo spinowe (ang. *fast spin echo*)

FSH – hormon folikulotropowy

GLMM – uogólnione liniowe modele efektów mieszanych

GnRH – hormon uwalniający hormony gonadotropowe

GPR54 – receptor związany z białkiem G dla kisspeptyny

*Gpr54* – gen kodujący receptor związany z białkiem G dla kisspeptyny

HF – dieta wysokotłuszczowa

IHH – idiopatyczny hipogonadyzm hipogonadotropowy

IL-1b – interleukina 1b

IL-6 – interleukina 6

IL-10 – interleukina 10

K – grupa kontrolna

KAF – dieta kafeteryjna

*Kiss1* – gen kodujący kisspeptynę

KISS1 – produkt białkowy genu kodującego kisspeptynę

*Kiss1r* – gen receptora dla kisspeptyny (wg. najnowszej nomenklatury)

KNDy – neurony zawierające neurokininę, dynorfinę oraz kisspeptynę

KP – kisspeptyna

LH – hormon luteinizujący

MRI – rezonans magnetyczny

mRNA – matrycowy RNA

mTOR – kinaza białkowa treoninowo-serynowa (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*)

NAc – jądro półleżące

NAD<sup>+</sup> - dinukleotyd nikotynamino-adeninowy

NKB – neurokinina B

NMR – jądrowy rezonans magnetyczny

pAMPK – kinaza białkowa aktywowana fosforylowanym monofosforanem adenozyiny (ang. *5'AMP-activated protein kinase*)

*Pdyn* – gen kodujący dynorfinę A

PND – dzień postnatalny (ang. *postnatal day*)

POA – jądro przedwzrokowe podwzgórza

PPG – oś podwzgórza-przysadka mózgowa-gonady

PVpo – okołobrzusne jądro przedwzrokowe

RNA – kwasy rybonukleinowe

RP3V – rostralny obszar komory trzeciej

rt-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse-transcription polymerase chain reaction*)

*Sirt1* – gen kodujący sirtuinę 1

SIRT1 – produkt białkowy genu kodującego sirtuinę 1

T – testosteron

*Tac2* – gen kodujący neurokininę B

T2DM – cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*)

TNF- $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$

VLDL – lipoproteiny o małej gęstości

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

## Streszczenie w języku polskim

Nadwaga i otyłość zaliczane są do chorób cywilizacyjnych. W obecnych czasach popularne stało się spożywanie produktów wysoce przetworzonych charakteryzujących się dużą zawartością tłuszczu, cukrów prostych oraz soli. Taki rodzaj diety nazywany jest dietą typu zachodniego, a w badaniach prowadzonych na zwierzętach dietą kafeteryjną (KAF). Zwierzęta utrzymywane na KAF otrzymują produkty, które są ogólnodostępne w sklepach. Długoterminowa konsumpcja tej diety prowadzi do nadmiernej akumulacji tkanki tłuszczowej, zaburzeń profilu metabolicznego, hormonalnego i rozwoju stanu zapalnego organizmu. Co więcej, zgodnie z teorią programowania prenatalnego, predyspozycje do wystąpienia zaburzeń wywołanych niezdrową dietą mogą być przekazywane z pokolenia na pokolenie. Środowisko żywieniowe matki w trakcie ciąży może wpływać na wystąpienie problemów zdrowotnych u potomstwa, które utrzymują się nawet w okresie dorosłości. Ponadto niewłaściwa dieta matek zaburza funkcje układu rozrodczego potomstwa. Choć odpowiedzialne za te procesy mechanizmy nie są dobrze poznane.

Reprodukcja jest regulowana przez oś podwzgórze-przysadka-gonady (PPG). Istotnym pomostem łączącym funkcje metaboliczne i rozrodcze jest kisspeptyna (KP), peptyd ulegający ekspresji zarówno w podwzgórzu, jak i w tkankach peryferyjnych. Działa ona za pośrednictwem receptora GPR54 (Kiss1r), będąc najsilniejszym z poznanych dotąd aktywatorów osi PPG. W jądrze łukowatym podwzgórza, oprócz neuronów wykazujących ekspresję KP, stwierdzono także obecność neuronów z ekspresją neurokininy B oraz dynorfiny A. Neurony te nazwano KNDy, od pierwszych liter nazw neuropeptydów (ang. kisspeptin/neurokinin B/dynorphin A). Ponadto, sirtuina 1 (SIRT1) jest kluczowym elementem maszyny epigenetycznej, która reguluje procesy dojrzewania płciowego poprzez przekazywanie informacji o stanie metabolicznym organizmu do neuronów KNDy.

W pracy postawiono następujące hipotezy:

- 1) Matczyna KAF podawana w okresie przed ciążą oraz w czasie ciąży i laktacji wpływa w płciowo-zależny sposób na masę i skład ciała potomstwa.**

- 2) **Matczyzna KAF podawana w okresie przed ciążą oraz w czasie ciąży i laktacji zmienia w płciowo-zależny sposób profil metaboliczny, hormonalny, immunologiczny oraz funkcje rozrodcze, potomstwa.**
- 3) **Układ Sirt1/Kiss1 w podwzgórzu i/lub wątrobie przynajmniej częściowo przyczynia się do obserwowanych zmian metabolicznych i zaburzeń rozrodczych potomstwa spowodowane KAF matki.**

Badano zarówno krótkotrwały (10 tyg., eksperyment 1), jak i długotrwały (16 tyg., eksperyment 2) efekt działania KAF matki na potomstwo.

W celu testowania powyższych hipotez analizowano wpływ matczynej KAF na profil metaboliczny, hormonalny i immunologiczny przy użyciu testów ELISA oraz poziom mRNA (rt-PCR) dla genów związanych z dojrzewaniem płciowym i rozrodem zarówno w podwzgórzu, jak i w wątrobie.

Wyniki do niniejszej rozprawy doktorskiej powstały na bazie dwóch eksperymentów przeprowadzonych na samicach szczura Wistar oraz ich potomstwie. W doświadczeniach badano dwie grupy: grupę karmioną KAF, składającą się z ogólnie dostępnych produktów w sklepach, o dużej zawartości węglowodanów i tłuszczu oraz kontrolną (K), która otrzymywała dietę półsyntetyczną AIN93G.

**W eksperymencie 1 podczas krótkotrwałej ekspozycji na dietę matek**, samice utrzymywane były na KAF przez okres 4 tyg. przed zapłodnieniem oraz w trakcie ciąży (21) i laktacji (21). W 3 dniu po urodzeniu (PND 3) potomstwo zostało zważone i ocenione pod względem płci. W PND 25 potomstwo matek z grupy KAF i K zważono oraz zbadano pod kątem składu ciała i procentowej zawartości tkanki tłuszczowej. W tym dniu potomstwo zostało poddane eutanazji, a następnie pobrano tkanki do dalszych analiz (krew, mózg oraz wątroba).

**W eksperymencie 2 podczas długotrwałej ekspozycji na dietę matek**, samice otrzymywały KAF przez 10 tyg. przed zapłodnieniem, w trakcie ciąży i laktacji. Potomstwo po odstawieniu od matek karmione było kontrolną dietą półsyntetyczną AIN93G. Tkanki (krew, mózg oraz wątroba) zostały pobrane od potomstwa w trzech punktach czasowych: od samic 30, 35 i 65 dniu życia; od samców w 40, 45 i 65 dniu życia. Dodatkowo, w wymienionych wyżej punktach czasowych potomstwo było wazone oraz badane pod kątem składu ciała i procentowej zawartości tkanki tłuszczowej.

W celu oceny wpływu KAF matki na potomstwo przeprowadzono następujące analizy: oceniono profil metaboliczny, tj. poziom glukozy, insuliny, cholesterolu oraz trójglicerydów w surowicy krwi (eksperyment 1 i 2). Oceniono profil immunologiczny: poziom interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 10 (IL-10) oraz czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) w surowicy krwi (eksperyment 1). Analizowano również status hormonalny, tj. poziom estradiolu (dla samic), testosteronu (dla samców) oraz hormonu luteinizującego (dla obu płci) w surowicy krwi (eksperyment 2). Porównano poziom mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, w podwzgórzu oraz *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1* w wątrobie samic i samców z grup KAF i K (eksperyment 1 i 2). Dodatkowo w eksperymencie 2 badano poziom mRNA dla *Pdyn* i *Tac2* w podwzgórzu i analizowano rozwarcie pochwy u żeńskiego potomstwa, jako zewnętrzny marker procesu rozpoczęcia dojrzewania płciowego.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów uzyskano następujące wyniki: **Eksperyment 1: 1)** Potomstwo matek KAF w PND 25 charakteryzowało się obniżoną masą ciała i wyższą procentową zawartością tkanki tłuszczowej. **2)** Matczyna KAF zaburzała w płciowo-specyficzny sposób: **i)** profil metaboliczny potomstwa w PND 25, a efekty te były większe u żeńskiego potomstwa; **ii)** profil immunologiczny potomstwa (poziom IL-6, IL-10 oraz TNF- $\alpha$ ), a efekty diety były większe u samic. **3)** Wykazano po raz pierwszy, że KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla *Kiss1* w podwzgórzu oraz poziomie mRNA dla *Kiss1* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa na bardzo wczesnych etapach rozwoju, bo już w PND 25.

**Eksperyment 2: 1)** Potomstwo (zarówno samice jak i samce) w badaniu z długotrwałą ekspozycją matek na KAF miało obniżoną masę ciała, a potomstwo żeńskie dodatkowo wykazywało zaburzenia w składzie ciała. **2)** KAF matki skutkowało u potomstwa podwyższonym poziomem cholesterolu i trójglicerydów oraz płciowo-specyficzne zmianami w poziomie glukozy, insuliny w surowicy krwi. Ponadto samce z grupy KAF charakteryzowały się podwyższonym poziomem LH w PNDs 45 i 60 w porównaniu do PND 40; **3)** Żeńskie potomstwo samic z grupy KAF wykazywało opóźnione o 3 dni rozpoczęcie dojrzewania płciowego w porównaniu do grupy K. **4)** Zaobserwowano również zależne od płci zmiany poziomu mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1* w podwzgórzu oraz *Kiss1* i *Sirt1* w wątrobie. **i)** Samice z grupy KAF charakteryzował niższy poziom transkrypty dla *Sirt1* w podwzgórzu w PND 30 i 35 w porównaniu do PND 60. **ii)** Męskie

potomstwo samic z grupy KAF w PND 45 cechowało się obniżonym poziomem mRNA dla *Gpr54* w podwzgórzu i dla *Sirt1* w wątrobie porównaniu do grupy K.

Na podstawie obu eksperymentów wyciągnięto następujące wnioski:

- 1) Potomstwo matek KAF charakteryzuje się obniżoną masą ciała oraz zaburzeniami składu ciała.
- 2) Ekspozycja na KAF przed ciążą oraz w okresie prenatalnym i wczesno postnatalnym prowadzi do wystąpienia płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym, hormonalnym i immunologicznym potomstwa.
- 3) Potomstwo płci żeńskiej jest bardziej wrażliwe na efekty krótkotrwałej ekspozycji na KAF matki w przypadku oceny parametrów metabolicznych i immunologicznych.
- 4) Po raz pierwszy udowodniono, że już na bardzo wczesnych etapach rozwoju, bo w PND 25, KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla *Kiss1* w podwzgórzu oraz poziomie transkryptu dla *Kiss1* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa.
- 5) Po raz pierwszy pokazano, że długotrwała ekspozycja na KAF przed ciążą oraz w okresie prenatalnym i wczesno postnatalnym przyczynia się do opóźnienia dojrzewania płciowego potomstwa żeńskiego.
- 6) Zmiany w układzie *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu i w wątrobie potomstwa mogą przyczyniać się do obserwowanych płciowo-specyficznych efektów metabolicznych i zaburzeń funkcji układu rozrodczego spowodowanych ekspozycją na KAF matki.

## Summary in English

Overweight and obesity are classified as lifestyle diseases. Nowadays, it has become popular to consume highly processed products characterized by a high content of fats, simple sugars, and salt. This type of diet is called the Western-style diet or, in animal studies, the cafeteria diet (CAF). Animals kept on the CAF diet receive products available in stores. Long-term consumption of this diet leads to excessive accumulation of adipose tissue, disturbances in the hormonal metabolic profile, and the development of inflammation in the body.

Moreover, according to the theory of prenatal programming, the predisposition to disorders caused by an unhealthy diet can be passed down from generation to generation. The mother's nutritional environment during pregnancy may affect the onset of health problems in the offspring, which will persist even into adulthood. In addition, an improper maternal diet disturbs the functions of the reproductive system of the offspring. Although the mechanisms responsible for these processes still need to be better understood.

Reproduction is regulated by the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. An important bridge between metabolic and reproductive functions is kisspeptin (KP), a peptide expressed in both the hypothalamus and peripheral tissues. It acts via the GPR54 (*Kiss1r*) receptor and is known as the most potent activator of the HPG axis. In the arcuate nucleus of the hypothalamus, in addition to KP-expressing neurons, the neurons expressing two other peptides - neurokinin B and dynorphin A are present. These neurons are called KNDy, from first letters of names neuropeptides (kisspeptin/neurokinin B/dynorphin A).

In addition, sirtuin 1 (SIRT1) is a critical element of the epigenetic machinery that regulates the processes of sexual maturation by transmitting information about the body's metabolic state to KNDy neurons.

The following hypotheses were tested:

- 1) Maternal CAF administered before pregnancy and during pregnancy and lactation affects in a sex-dependent manner the weight and body composition of the offspring.**



- 2) **Maternal CAF administered before pregnancy and during pregnancy and lactation alters metabolic, hormonal, immunological profile and reproductive functions of offspring in sex-specific manner.**
- 3) **The *Sirt1/Kiss1* system in the hypothalamus and/or liver at least partly contributes to the observed metabolic changes and reproductive disorders of the offspring caused by maternal CAF.**

The short-term (10 weeks, experiment 1) and long-term (16 weeks, experiment 2) effects of the mother's CAF on the offspring were studied.

In order to test the above hypotheses, the effects of the maternal CAF on the metabolic, hormonal, and immunological profile were investigated using ELISA assays and mRNA transcript levels (rt-PCR) for pubertal and reproductive genes in both the hypothalamus and the liver. The results of this doctoral dissertation were based on two experiments carried out on female Wistar rats and their offspring. Two groups of animals were studied: a group with metabolic disorders induced by the cafeteria diet (CAF), composed of commercially available products with a high content of carbohydrates and fats, and a control group (C), which received the AIN93G semi-synthetic diet.

**In experiment no. 1 - short-term exposure to maternal diet** - females were kept on CAF for 4 weeks before conception and during pregnancy (21 days) and lactation (21 days). On postnatal day 3 (PND 3), the offspring were weighed and sexed. On PND 25, the offspring of CAF and C mothers were weighed and examined for body composition and fat content. The offspring were euthanized on that day, and tissues were collected for further analysis (blood, brain, and liver).

**In experiment no. 2 - long-term exposure to maternal diet**, females received CAF for 10 weeks before conception, during pregnancy, and lactation. After weaning, offspring were fed a control semi-synthetic AIN93G diet. Tissues (blood, brain, and liver) were collected from the offspring at three-time points: for females 30, 35, and 65 days of age; for males at 40, 45, and 65 days. In addition, at the time mentioned above, the offspring were weighed and examined for body composition and fat content.

In order to assess the impact of the mother's CAF on the offspring, the following analyzes were carried out: the metabolic profile, i.e., the level of glucose, insulin, cholesterol, and triglycerides, was assessed (experiments 1 and 2). The immunological profile was assessed: levels of interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), and tumor

necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (experiment no 1). Hormonal status was assessed based on the level of estradiol (for females), testosterone (for males), and luteinizing hormone (for both sexes) (experiment no 2). Transcript levels for *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* and *Tac2* in the hypothalamus and *Kiss1*, *Gpr54* and *Sirt1* in the liver were checked (experiment 1 and 2). In addition, in experiment no 2, mRNA levels for *Pdyn* and *Tac2* in the hypothalamus were examined. Moreover, in experiment no 2, vaginal opening in female offspring was analyzed as an external marker of the onset of puberty.

Based on the conducted experiments, the following results were obtained:

**Experiment no 1:** **1)** A reduced body weight and a higher fat percentage characterized the offspring of CAF mothers on PND 25. **2)** The maternal CAF affected in a sex-specific manner: **i)** the metabolic profile of the offspring on PND 25, and these effects were prominent in the female offspring; **ii)** the immune profile of the offspring (levels of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ ), and the effects of the diet were more robust in females. **3)** It was shown for the first time that the mother's CAF leads to sex-dependent changes in the level of mRNA transcript for *Kiss1* in the hypothalamus and the level of mRNA for *Kiss1* and *Sirt1* in the liver of the offspring at very early stages of development, already on PND 25.

**Experiment no 2:** **1)** Offspring (both females and males) in the long-term exposure study of mothers on the CAF had reduced body weight. Additionally, female offspring have altered body composition. **2)** Mother's CAF resulted in: **i)** increased cholesterol and triglyceride levels and sex-specific changes in glucose and insulin levels. In addition, CAF males had elevated LH levels on PNDs 45 and 60 compared to PND 40; **3)** Females from CAF dams showed a three-day delay in onset of sexual maturation compared to group C. **4)** Sex-dependent changes in mRNA levels for *Kiss1*, *Gpr54* and *Sirt1* in the hypothalamus and *Kiss1* and *Sirt1* in the liver were also observed: **ii)** CAF females had a lower level of mRNA for *Sirt1* in the hypothalamus on PNDs 30 and 35 compared to PND 60. **ii)** CAF males on PND 45 were characterized by reduced transcript levels for *Gpr54* 1 in the hypothalamus and *Sirt1* in the liver on PND 45 compared to C group.

The following conclusions were drawn from both experiments:

- 1)** The offspring of CAF mothers are characterized by reduced body weight and body composition disorders.

- 2) Exposure to the CAF before pregnancy, during prenatal and early postnatal periods leads to sex-specific changes in the offspring's metabolic, hormonal, and immunological profiles.
- 3) Female offspring are more sensitive to the effects of short-term exposure to the mother's CAF when assessing metabolic and immunological parameters.
- 4) It has been proven for the first time that already at the very early stages of development, i.e., PND 25, the mother's CAF leads to sex-dependent changes in the level of mRNA for *Kiss1* in the hypothalamus and the level of mRNA for *Kiss1* and *Sirt1* in the liver of the offspring.
- 5) It has been shown for the first time that long-term exposure to the CAF before pregnancy, and during prenatal and early postnatal periods diet delay sexual maturation in female offspring.
- 6) Changes in the *Sirt1/Kiss1* system in the hypothalamus and the offspring's liver may contribute to the observed sex-specific metabolic effects and reproductive system dysfunction caused by exposure to the mother's CAF.

## **I Wstęp**

### **1. Otyłość – choroba cywilizacyjna**

Otyłość wynika z zaburzeń równowagi energetycznej, którym sprzyja nadmierne spożycie kalorii i mała aktywność fizyczna. Ponadto kompozycja makroskładników w diecie może przyczyniać się do rozwoju nadmiernej masy ciała, która z kolei uważana jest za główny czynnik ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 (T2DM) (1). Szacuje się, że u 61% osób otyłych w późniejszym okresie życia rozwinię się T2DM, która stanowi 90% przypadków cukrzycy notowanych na całym świecie. Ze względu na częstość występowania oraz poważne konsekwencje zdrowotne WHO uznała obie jednostki za choroby cywilizacyjne (2). Poza zaburzeniami homeostazy metabolicznej skutkujących insulinoopornością i dyslipidemią, otyłość może prowadzić do rozwoju chorób układu krwionośnego, a także chorób nerek i nowotworów. Otyłość i T2DM należą również do czynników ryzyka choroby Alzheimera będącej najczęstszą postacią demencji (2, 3). Te choroby metaboliczne przyczyniają się także do zaburzeń w funkcjonowaniu układu rozrodczego (4, 5).

Przewiduje się, że do 2030 roku liczba dorosłych osób z nadwagą i otyłością wyniesie odpowiednio 1,35 mld i 573 mln (6). Dlatego otyłość i jej choroby współistniejące są ważnym obszarem badań nauk podstawowych i klinicznych.

### **2. Programowanie prenatalne**

Zgodnie z koncepcją programowania prenatalnego, czynniki środowiskowe działające w łonie matki mogą w pewnym stopniu zaprogramować rozwój organizmu, w tym układu neuroendokrynnego potomstwa i doprowadzić do rozwoju zaburzeń metabolicznych (np. otyłości i cukrzycy) oraz reprodukcyjnych. Ponadto u ludzi stwierdzono silną korelację pomiędzy niską masą urodzeniową, wysokim poziomem kortyzolu i późniejszym rozwojem nadciśnienia tętniczego i cukrzycy typu 2 (7-9). Potomstwo matek, które cierpią na cukrzycę w czasie ciąży jest narażone na większe ryzyko rozwoju otyłości i nieprawidłowego metabolizmu glukozy nie tylko w dzieciństwie, ale także w okresie dojrzewania i dorosłości (10).

### **3. Modele zwierzęcej otyłości z wyróżnieniem modelu ekspozycji na dietę kafeteryjną (KAF)**

Badacze stosują modele zwierzęce otyłości w celu poznania molekularnych mechanizmów powstawania tego schorzenia oraz poszukiwania strategii jej leczenia (11-15). Istnieje wiele zwierzęcych modeli otyłości, zarówno tych genetycznych, jak i indukowanych dietą (11-15). W tej rozprawie doktorskiej skupiono się na modelu diety kafeteryjnej (KAF), która zostanie poniżej opisana.

Tak zwana "dieta zachodnia" jest odzwierciedleniem niezdrowych nawyków żywieniowych ludzi i spożywana jest głównie w krajach średnio i wysoko rozwiniętych. Charakteryzuje się ona spożywaniem żywności wysoko przetworzonej, dużych ilości masła, potraw smażonych, wysokotłuszczowych produktów mlecznych, jaj, rafinowanych zbóż, ziemniaków i napojów wysoko słodzonych (16). W celu naśladowania efektów działania takiej diety w warunkach laboratoryjnych stosuje się KAF, składającą się z różnorodnych produktów, które cechują się wysoką smakowitością przy jednoczesnej wysokiej gęstości energetycznej (17-19). W KAF około 45- 55% energii pochodzi z tłuszczów (17-19). Do składników powszechnie stosowanych w tej diecie należą: herbatniki, chipsy, masło orzechowe, czekolada, batony czekoladowe, sery, wędliny, dżemy, babeczki, ciastka i suszone owoce (17, 19, 20). KAF poprzez wykorzystywanie produktów ogólnodostępnych w sklepach bardzo dobrze naśladuje popularne wśród ludzi posiłki typu „fast food” (21), których spożywanie może przyczyniać się do rozwoju otyłości. Początkowo model diety KAF zastosowali Rothell i Stock, natomiast obecnie ten typ diety wykorzystywany jest przez wielu badaczy (18).

Podobnie jak w przypadku ludzi spożywających dietę „typu zachodniego”, u dorosłych zwierząt KAF sprzyja kompulsywnemu przyjmowaniu pokarmów (19, 22-24). Spożywanie KAF indukuje lipogenezę i zmniejsza eksport lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL), co prowadzi do akumulacji lipidów w wątrobie i stłuszczenia wątroby (25-28). Towarzyszy temu wzrost stężenia cholesterolu, glukozy i trójglicerydów we krwi (23, 29-31), co skutkuje gromadzeniem tłuszczu brzuszego i trzewnego oraz insulinoopornością (23, 26, 29).

Dieta wysokotłuszczowa (HFD - ang. *high fat diet*), jak i KAF prowadzą do rozwoju otyłości i hepatosteatozy (powiększenia wątroby) u dorosłych zwierząt. Jednak

szczury karmione KAF w odróżnieniu od zwierząt utrzymywanych na HFD i diecie standardowej wykazywały stan zapalny w białej tkance tłuszczowej, brązowej tkance tłuszczowej i wątrobie (19). Ponadto testy tolerancji glukozy i insuliny wykazały hiperinsulinemię, hiperglikemię i nietolerancję glukozy u szczurów karmionych KAF w porównaniu do kontroli i szczurów karmionych HFD (19). W badaniach przeprowadzonych przez Zenni i wsp. pokazano, że myszy utrzymywane przez 15 tygodni na KAF miały wyższą masę ciała i zawartość tłuszczu trzewnego w porównaniu nie tylko do kontroli, ale także do zwierząt karmionych HFD (24).

Z powyżej omówionych powodów stosowanie KAF dobrze naśladuje działanie niezdrowej „diety zachodniej” spożywanej przez ludzi. Jednak pomimo tego, że wiele grup badawczych stosuje w swoich eksperymentach KAF, warto również wspomnieć o niedoskonałościach tego modelu. Znając skład diety oraz wartości odżywcze poszczególnych produktów, trudno jest oszacować przyjmowaną przez zwierzęta ilość określonych składników pokarmowych. KAF zazwyczaj składa się z kilku bądź kilkunastu różnych produktów, które zwierzęta mogą wybierać według preferencji. Ponadto nie ma ustandaryzowanego protokołu przygotowania KAF, wyselekcjonowanych produktów ani zakresu wartości odżywczych poszczególnych produktów (32). Co więcej, procent wartości energetycznej pozyskanej z węglowodanów i tłuszczu w KAF bardzo się różni pomiędzy badaniami (17-60% dla węglowodanów oraz 37-73% dla tłuszczu) (32-34). Dodatkowo, w niektórych badaniach KAF podawana jest samodzielnie, natomiast w innych łącznie z dodatkiem diety standardowej.

#### **4. Model zwierzęcy wywoływania otyłości u potomstwa poprzez ekspozycję matek w okresie ciąży i/lub laktacji na KAF**

##### **4.1. KAF podawana matkom w okresie ciąży i/lub laktacji zmienia parametry metaboliczne potomstwa**

Potomstwo szczurów urodzone przez matki utrzymywane na KAF różni się pod względem masy ciała i zawartości tkanki tłuszczowej, poziomu glukozy, insuliny, leptyny i trójglicerydów w porównaniu do potomstwa od matek utrzymywanych na diecie standardowej (35-37).

Ponadto, potomstwo pochodzące od matek spożywających KAF podczas laktacji ma niższą masę ciała i masę beztłuszczową, ale większą akumulację tkanki tłuszczowej, w porównaniu do kontroli w wieku 3 miesięcy. Stąd też zaproponowana została hipoteza mówiąca o tym, że karmienie matek dietą KAF prowadzi do wykształcenia u potomstwa fenotypu charakteryzującego się niższą masą ciała, ale większym nagromadzeniem tkanki tłuszczowej (ang. *thin-outside-fat-inside*) u potomstwa (37). Wykazano bowiem, że po odstawieniu (PND 21 - ang. *Postnatal day*) potomstwa szczurów od matek utrzymywanych na KAF przed ciążą, w czasie ciąży i laktacji miało ono niższą masę ciała, ale wyższy procent zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie w porównaniu z kontrolą (38). Dodatkowo, zarówno męskie, jak i żeńskie potomstwo KAF karmione przez 6 tygodni po odstawieniu dietą standardową, pozostawało lżejsze od kontroli, jednak nie było już różnicy w procentowej zawartości tkanki tłuszczowej między grupami (38).

Doświadczenia przeprowadzone przez Sagae i wsp. na samicach szczurów utrzymywanych na KAF wykazały indukcję otyłości u potomstwa przejawiającą się zwiększeniem masy ciała, poziomu trójglicerydów, cholesterolu oraz insulinoopornością (39). W innym badaniu w przez Bazzano i wsp. 22-dniowe samice szczurów karmione KAF charakteryzowały się otyłością i hiperglikemią, natomiast nie wykazywały zmian w poziomie trójglicerydów i cholesterolu w surowicy krwi (40).

Warto zaznaczyć, że efekty działania KAF różnią się w zależności od zastosowanego przebiegu eksperymentu (np. czasu podawania diety, składu diety, czasu ekspozycji na dietę), a także gatunku zwierząt i płci potomstwa (7, 41, 42).

#### **4.2. Dieta KAF matki wywołuje proces zapalny u potomstwa**

KAF podawana w okresie dorosłym prowadzi do rozwoju procesu zapalnego u dorosłych gryzoni, która przejawia się aktywacją układu immunologicznego. Piętnastotygodniowe podawanie KAF podniosło poziom interleukiny 6 (IL-6) w surowicy krwi samców myszy (24). Co więcej, podawanie tej przez 18 tygodni samcom szczurów podnosi poziom czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i obniża poziom IL-10 (43). Z drugiej strony, krótsza ekspozycja (przez 6 tygodni) na dietę KAF nie miała wpływu na parametry zapalne (takie jak stężenie TNF- $\alpha$  i IL-6) u samców szczurów (44).

Otyłość matki wiąże się również z indukowaniem przewlekłego stanu zapalnego w organizmie, charakteryzującego się podwyższoną zawartością tkanki tłuszczowej, ogólnoustrojowych cytokin prozapalnych oraz akumulacją makrofagów tkanki tłuszczowej (45). Zmiany te występują także w łożysku, co sugeruje, że otyłość matki naraża płód na środowisko stanu zapalnego podczas jego rozwoju (46-49).

Badano wpływ prenatalnej ekspozycji na KAF na powstawanie procesów zapalnych potomstwa z uwzględnieniem różnych parametrów charakteryzujących proces zapalny (50, 51). KAF podawana samicom przez 3 tygodnie przed ciążą oraz w czasie ciąży i laktacji zwiększała ekspresję cytokiny *Il6* oraz zmniejszała ekspresję *Il1b* w mózgu – w jądrze półleżącym (NAc), natomiast nie wpłynęła na ekspresję mRNA *Tnf* w NAc u męskiego potomstwa (F1) (51). Kontynuacja tych badań pokazała, że w pokoleniu F2 oraz F3 zaobserwowano obniżony poziom IL-10 w surowicy krwi, natomiast nie zaobserwowano różnic w poziomie IL-6 w porównaniu z grupą kontrolną (52). Natomiast w innym doświadczeniu zaobserwowano, że żywienie KAF przez 8 tygodni przed ciążą oraz w trakcie ciąży zwiększało ekspresję IL-6 w łożysku, natomiast nie zmieniało markerów zapalnych w wątrobie płodów w 21 dniu ciąży (50).

Przytoczone powyżej badania wykazały, że spożywanie KAF przez matki przed oraz w trakcie ciąży i/lub laktacji wywołuje powstanie stanu zapalnego u potomstwa. Jednakże istnieje niewiele doniesień na temat specyficznych dla płci różnic w efektach diety u potomstwa, a dane często są niepełne (dotyczące tylko jednej płci) lub sprzeczne (35-37, 53). Ponadto niewiele jest badań na temat działania diety matki na układ rozrodczy potomstwa.

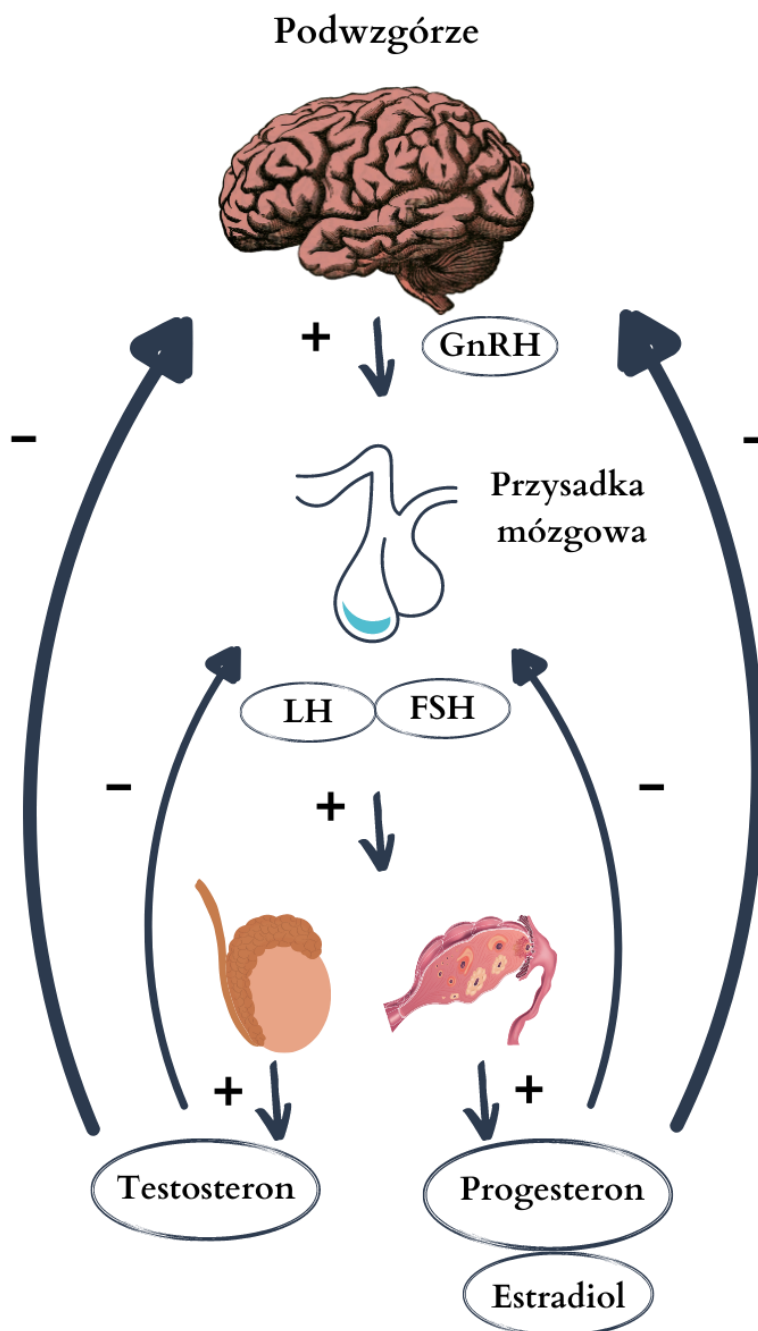
## **5. Oś podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady (PPG) i regulacja jej działania**

Funkcje rozrodcze regulowane są przez oś podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady (PPG). Neurohormon uwalniający gonadotropiny zwany również gonadoliberyną (GnRH), produkowany w podwzgórzu jest uważany za główną cząsteczkę, która kontroluje reprodukcję u ssaków (54). GnRH pobudza przysadkę mózgową do wydzielania gonadotropin: hormonu luteinizującego (LH) i hormonu folikularnego (FSH) działających na gonady - jajniki i jądra, stymulując ich dojrzewanie, gametogenezę i produkcję hormonów steroidowych (54). Gonady z kolei regulują syntezę i wydzielanie neuropeptydów przysadkowych i podwzgórzowych poprzez dodatnie oraz ujemne sprzężenia zwrotne (**Ryc. 1**).



U mężczyzn FSH stymuluje aktywację komórek Sertoliego w gonadach, wspomagając spermatogenezę. Komórki Sertoliego, w odpowiedzi na FSH, wydzielają do układu krwionośnego inhibinę oraz niewielkie ilości estradiolu. LH u mężczyzn stymuluje produkcję testosteronu (T) z komórek Leydiga (55).

U kobiet hormonalna regulacja dojrzewania i rozrodu jest bardziej skomplikowana, ale podobnie jak u mężczyzn rozpoczyna się od wydzielania GnRH. Neurohormon ten wpływa na pulsacyjne wydzielanie LH i FSH. Podwyższony poziom LH u kobiet jest potrzebny do owulacji, natomiast FSH stymuluje tworzenie pęcherzyków i wydzielanie estrogenów (55).



**Rycina 1.** Oś podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady (PPG)

Rycina przedstawia działanie osi podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady u samic i samców; GnRH – hormon uwalniający gonadotropiny; LH – hormon luteinizujący; FSH – hormon folikulotropowy. + - stymulacja , - - hamowanie

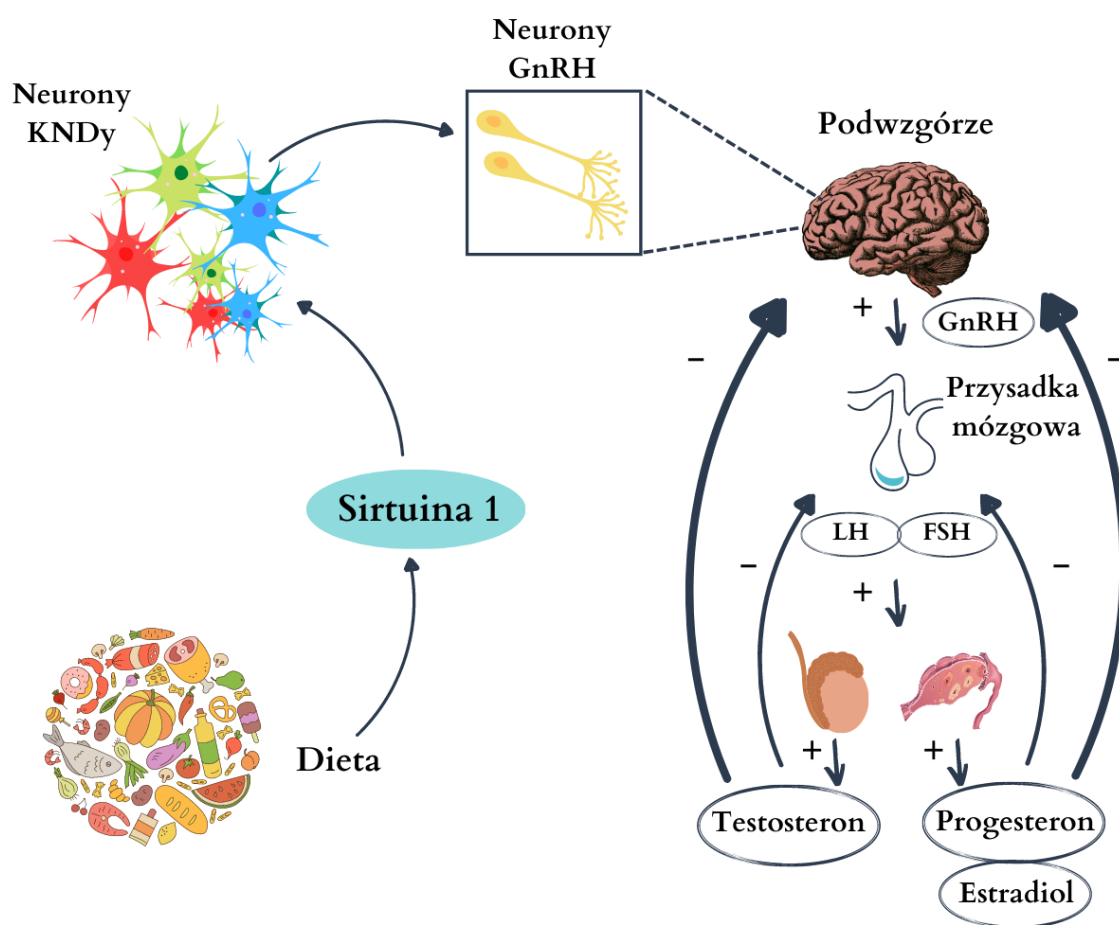
Chociaż już w latach 70. XX wieku wykazano, że inicjacja dojrzewania u ssaków wymaga aktywacji podwzgórzowych neuronów GnRH (56, 57), to dopiero odkrycie

kisspeptyny (KP) i dalsze badania ujawniły kluczową rolę tego peptydu w regulacji dojrzewania płciowego i regulacji funkcji osi PPG (58, 59). Co więcej, KP jest jak dotąd najsilniejszym stymulatorem osi PPG. Początkowo gen kodujący kisspeptynę został zidentyfikowany jako czynnik metastatyczny w 1996 roku i nazwany metastatyną (60). Produkt genu *KISS1* scharakteryzowano jako endogenne ligand dla receptora związanego z białkiem G GPR54 w 2001 roku i po raz pierwszy został wyizolowany z ludzkiego łożyska. Niedługo później wysoką ekspresję KP zaobserwowano także w mózgu, a w szczególności w podwzgórzu (61).

Wykazano jednak, że peptyd ten nie działa samodzielnie, lecz wspólnie z neurokininą B (NKB) i dynorfiną A (Dyn A). Udowodniono, że w jądrze łukowatym (ARC) podwzgórza znajdują się neurony nazwane KNDy (od pierwszych liter nazw neuropeptydów tj. kisspeptyny, neurokininy B i dynorfiny), w których zlokalizowane są wyżej wymienione peptydy regulujące funkcje rozrodcze (62) (**Ryc. 2**).

Ponadto, najnowsze badania dowiodły, że sirtuina 1 (kodowana przez gen *SIRT1*) działa w ARC jako cząsteczka odczytująca status energetyczny komórek (63). Sirtuina 1 jest deacetylazą klasy III zależną od dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NAD<sup>+</sup>), wrażliwą na restrykcję kaloryczną, metabolizm komórkowy oraz procesy starzenia. *SIRT1* ulega ekspresji w wielu tkankach m.in. w mózgu, wątrobie i gonadach (64).

Stwierdzono również, że *SIRT1* ulega ekspresji w podwzgórzowych neuronach kisspeptynoergicznych i hamuje ekspresję tego peptydu. Jednakże, w miarę zbliżania się okresu dojrzewania płciowego, ta supresja jest znoszona. Wykazano również, że nadmierne spożywanie pokarmu obniża poziom *SIRT1*, zwiększając w ten sposób ekspresję KP i przyspieszając dojrzewanie u samic szczurów (63) (**Ryc. 2**).



**Rycina 2.** Uproszczony schemat regulacji osi podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady (PPG) przez dietę, sirtuinę 1 i neurony KNDy.

Na rycinie zaprezentowano możliwe oddziaływanie diety poprzez sirtuinę 1 na neurony KNDy oraz oś podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady ; GnRH – Gonadoliberyna; LH – Hormon luteinizujący; FSH – Hormon folikulotropowy. + - stymulacja , - - hamowanie

### 5.1. Zaburzenia dojrzewania i rozmnażania potomstwa

Jak wspomniano wyżej, wykazano że kisspeptyna jest kluczowa dla inicjacji dojrzewania (58, 59). Badania przeprowadzone przez grupę de Roux nad idiopatycznym hipogonadyzmem hipogonadotropowym (IHH) znacznie poszerzyły wiedzę na temat roli KP w zakresie biologii rozrodu (58). W badanej przez tych naukowców rodzinie u każdego z rodzeństwa stwierdzono niskie stężenia gonadotropin i hormonów gonadalnych (testosteronu u mężczyzn oraz estradiolu u kobiet) oraz obecność mutacji w genie receptora kisspeptyny (*KiSS1r*). Na tej podstawie wykazano, że podwzgórzowy

układ *Kiss1/Kiss1r* jest odpowiedzialny za kontrolę rozrodu, w tym inicjację dojrzewania.

Podobne wnioski wyciągnięto z badań przeprowadzonych przez Seminara i wsp., gdzie zespół IHH rozpoznano u sześciu członków rodziny (4 mężczyzn i 2 kobiety) (59). Stwierdzono, że choroba ta jest wynikiem mutacji w genie kodującym receptor KP. W przebiegu hipogonadyzmu hipogonadotropowego stwierdzono również nieprawidłowe funkcjonowanie gonad. W efekcie skutkuje to utrudnionym osiągnięciem dojrzałości płciowej lub nawet niemożliwością jej osiągnięcia, co może prowadzić do zakłóceń płodności lub wręcz niepłodności. Choroba ta charakteryzuje się również zmniejszeniem wydzielania LH i FSH przez przysadkę mózgową (65).

W badaniach przeprowadzonych przez Novaira i wsp. w modelu mysim z delecją w genie kodującym receptor KP tylko w neuronach gonadotropowych (GnRH) zarówno u samców, jak i samic wykazano niższą ekspresję mRNA dla *Kiss1r* w podwzgórzu (66). Ponadto samice z tymi mutacjami osiągały dojrzałość płciową średnio 9 dni później niż samice kontrolne. W przypadku samców z powyższą mutacją dojrzałość osiągnęło tylko 20% z nich, z 7-9 dniowym opóźnieniem w stosunku do grupy kontrolnej. Dodatkowo samice z mutacjami miały zaburzony cykl płciowy, objawiający się zahamowaniem cykliczności i zatrzymaniem na około 83% całkowitego czasu cyklu w fazie metestrus lub diestrus. Zarówno u samców jak i samic z mutacją poziom LH i FSH był obniżony. Wykazano również, że myszy obu płci z mutacją nie reagowały na podanie egzogennej KP (66).

Natomiast badania Narayanaswamy i wsp. wykazały, że podanie KP w dawce 0,3 lub 1,0 nmol/kg/h może być skutecznie wykorzystane do stymulacji wydzielania gonadotropin u zdrowych kobiet (67). Stwierdzono również pozytywny wpływ KP na wydzielanie LH i nieco mniejszy na FSH (68). Ponadto stwierdzono, że KP stymuluje wystąpienie pokwitania u zwierząt (69, 70).

Wiele obserwacji klinicznych i badań w modelach zwierzęcych wskazuje na to, że otyłość prowadzi do zaburzeń związanych z dojrzewaniem i reprodukcją (71). Wykazano już, że KAF podawana przed ciążą, a także w czasie ciąży i laktacji przyspiesza otwarcie pochwy, a tym samym początek pokwitania u potomstwa samic szczurów Sprague Dawley. „Matki szczurze” w tym eksperymencie charakteryzowały się 28% otyłością (72). W badaniu, w którym KAF była podawana samicom szczurów Wistar

matkom przed i podczas ciąży, zaobserwowano również niższy poziom testosteronu u ich dorosłego potomstwa płci męskiej (73). Jednak mechanizm odpowiedzialny za opóźnione dojrzewanie u tych zwierząt nie został do tej pory dokładnie wyjaśniony.

Ponadto wykazano, że KP działa nie tylko na poziomie centralnym, tj. mózgu, a także obwodowo (74). Peptyd ten oraz jego receptor ulegają ekspresji również w gonadach szczurów i człowieka, a „niezdrowa dieta” może wpływać na dysfunkcje gonad (75-79). Potomstwo samców od matek karmionych KAF przed ciążą, w czasie ciąży i laktacji miało mniejsze jądra i zmniejszoną produkcję testosteronu, a także zaburzenia czasu rozpoczęcia dojrzewania płciowego (73). Zmiany te mogą być spowodowane zaburzeniami równowagi energetycznej we wczesnym okresie życia i mieć długotrwałe patologiczne konsekwencje w późniejszym okresie życia (71).

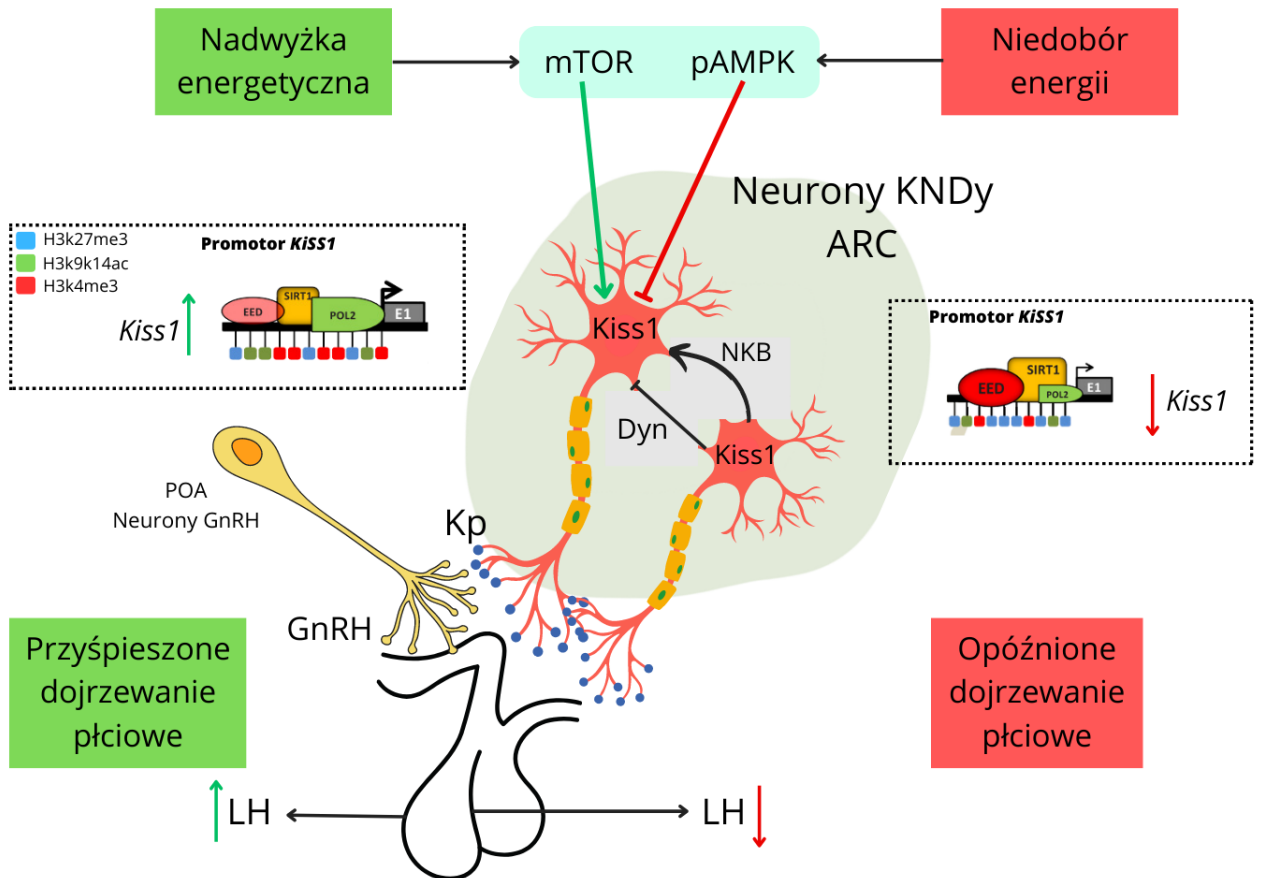
Potomstwo samic od matek utrzymywanych na KAF przed ciążą, w trakcie ciąży i/lub w czasie laktacji miało zmniejszoną pierwotną pulę pęcherzyków jajnikowych oraz zmniejszoną receptywność endometrium. Z kolei u męskiego potomstwa KAF odnotowano mniejsze jądra, zmniejszoną produkcję testosteronu i obniżoną jakość plemników (72, 73, 80). Co więcej, u potomstwa męskiego samic utrzymywanych na KAF stwierdzono zaburzenia zachowań seksualnych oraz spadek stężenia w osoczu krwi LH, FSH i T w wieku dorosłym (17). KAF miała również negatywny wpływ na jajniki potomstwa płci żeńskiej, zmniejszając liczbę oocytów i pęcherzyków preantralnych, a także grubość warstwy pęcherzykowej. Samice te miały również zmieniony profil hormonalny i nie wykazywały przedowulacyjnych skoków progesteronu i LH (39). W badaniu przeprowadzonym przez Bazzano i wsp. zaobserwowano zmiany w funkcji jajników. Samice charakteryzowały się wydłużoną fazą diestrus, miały obniżone stężenie estradiolu ( $E_2$ ) w surowicy krwi i zwiększoną liczbę pęcherzyków antralnych.

Powyższe dane wskazują na to, że KAF zmniejsza rezerwę jajnikową i zaburza proces owulacji, co prowadzi może do zaburzeń płodności u tych zwierząt (40).

Regulacja procesów rozrodczych, jak wcześniej wspomniano, odbywa się na poziomie mózgu. U gryzoni zlokalizowano populację neuronów wydzielających KP w obrębie jądra przednio-brzuszo przyśrodkowego podwzgórza (AVPV) i okołobrzusznego jądra przedwzrokowym (PVpo), określaną wspólnie jako populację neuronów KP w rostralnym (przednim) obszarze trzeciej komory (RP3V), która jest niezbędna do przedowulacyjnego wydzielania gonadotropin (81-83). Podczas gdy

neurony w ARC są potrzebne do zainicjowania procesu dojrzewania i pulsacyjnego wydzielania LH, to neurony KP w AVPV kontrolują gwałtowny wzrost wydzielania LH u samic, który niezbędny jest do owulacji (84).

Wykazano, że u kobiet sirtuinal hamuje dojrzewanie poprzez epigenetyczną represję aktywującego dojrzewanie genu *Kiss1* w podwzgórzu. Jednakże, gdy zbliża się okres dojrzewania, SIRT1 jest usuwana z promotora *Kiss1*. W wyniku tego zniesiona zostaje represja genu i zachodzi ekspresja genu *Kiss1* w podwzgórzu. Ponadto, status metaboliczny wpływa na zmiany ekspresji genów *SIRT1* i *KISS1*. W przypadku nadmiaru energii SIRT1 jest częściowo usuwana wraz z represorem (EED) z promotora *Kiss1*, co umożliwia zwiększoną ekspresję *KISS1*. Natomiast w przypadku niedoboru energii wysoki poziom SIRT1/EED jest utrzymywany, a promotor *Kiss1* tłumi ekspresję *KISS1*. Tak więc hamowanie *Kiss1* przez SIRT1 zostało zidentyfikowane jako kluczowy mechanizm epigenetyczny, poprzez który informacje żywieniowe i otyłość wpływają na dojrzewanie ssaków (63, 85, 86) (**Ryc. 3**).



**Rycina 3.** Udział mTOR, pAMPK i SIRT1 w kontroli dojrzewania płciowego.

Na rycinie zaprezentowano schematyczny model dotyczący prawdopodobnej funkcji mTOR i AMPK jako aktywatory i inhibitory neuronów KNDy w ARC w podwzgórzu. Równowaga mTOR/AMPK jest zależna od rezerw energetycznych organizmu. W warunkach nadmiaru energii dominuje aktywacja mTOR, natomiast przy niedoborze energetycznym ulega aktywacji AMPK; mTOR – kinaza białkowa treoninowo-serynowa; AMPK – kinaza aktywowana 5'AMP; *Kiss1* – gen kodujący kisspeptynę; Kp – kisspeptyna; GnRH – gonadoliberyna; POA – jądro przedwzrokowe podwzgórza; LH – hormon luteinizujący; EED – represor promotora genu *Kiss1*; Dyn – Dynorfina A; NKB – Neurokinina B. Rycina przygotowana na podstawie Vazquez i wsp. (86).

Jak już wspomniano, *Kiss1* poza podwzgórzem ulega ekspresji również w tkankach obwodowych biorących udział w regulacji funkcji metabolicznych, takich jak np. wątroba. Badania przeprowadzone przez Song i wsp. pokazały związek pomiędzy wątrobą, a endokrynną częścią trzustki w regulacji glikemii (87). Wykazano dodatni wpływ glukagonu na produkcję KP w wątrobie. Ponadto zaobserwowano podwyższony poziom KP zarówno w wątrobie, jak i w surowicy krwi pacjentów z T2DM. Udowodniono również że, KP działa hamująco na stymulowane glukozą wydzielanie insuliny z komórek  $\beta$  trzustki. Badania te mogą wskazywać na istnienie obwodu hormonalnego pomiędzy wątrobą a endokrynną częścią trzustki i wpływem wątrobowej KP na występowanie hiperglikemii poprzez hamowanie wydzielania insuliny w T2DM (87).

Ponieważ *SIRT1* wykazuje ekspresję w wątrobie, to zakłócenia w szlakach kontrolowanych przez *SIRT1* skutkują różnymi zaburzeniami metabolicznymi. Zatem aktywacja sirtuin poprzez manipulacje genetyczne lub farmakologiczne mogłyby przynieść korzyści w otyłości indukowanej dietą i cukrzycy typu 2 (88).



## II HIPOTEZY I CELE

W niniejszej rozprawie doktorskiej postawiono następujące hipotezy:

- 1) Krótkotrwała (10 tyg.) ekspozycja samic szczurów na KAF wpływa na masę i skład ciała jej potomstwa. **(Eksperyment 1)**
- 2) Krótkotrwała (10 tyg.) ekspozycja samic szczurów na KAF prowadzi do płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym i potomstwa. **(Eksperyment 1)**
- 3) Długotrwała (16 tyg.) ekspozycja samic szczurów na KAF prowadzi do płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym i hormonalnym potomstwa oraz zakłóca dojrzewanie płciowe u potomstwa płci żeńskiej. **(Eksperyment 2)**
- 4) Spożycie KAF przez samice szczurów przed ciążą oraz podczas ciąży i laktacji wywiera specyficzny płciowo wpływ na poziom mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* oraz *Tac2* w podwzgórzu oraz na poziom transkryptu dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* w wątrobie u ich potomstwa. **(Eksperymenty 1 i 2)**
- 5) Układ *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu i/lub wątrobie przynajmniej częściowo przyczynia się do obserwowanych zmian metabolicznych i zaburzeń rozrodczych potomstwa samic szczurów poddanych ekspozycji na KAF **(Eksperyment 1 i 2)**

Weryfikacja powyższych hipotez została przeprowadzona poprzez realizację następujących celów z wykorzystaniem modelu szczurzego:

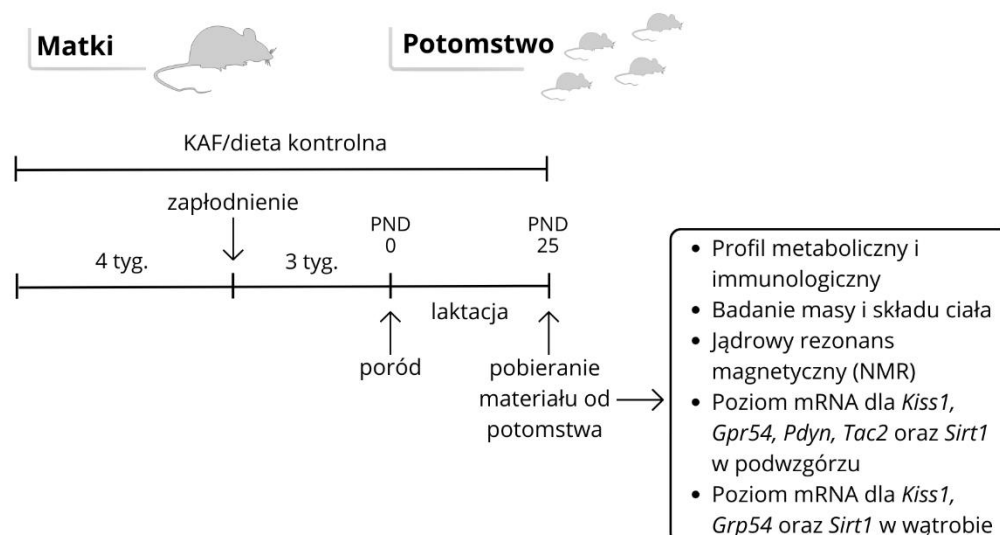
1. Ocena wpływu matczynej KAF podawanej w okresie przed ciążą oraz w czasie ciąży i laktacji na masę i skład ciała potomstwa.
2. Analiza ekspozycji matek na KAF przed ciążą oraz w trakcie ciąży i laktacji na wystąpienie płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym, hormonalnym i immunologicznym potomstwa.
3. Ocena długotrwałych efektów KAF matki na proces dojrzewania płciowego (poprzez analizę rozwarcia pochwy) potomstwa płci żeńskiej.
4. Porównanie poziomu transkryptu dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* i *Tac2* w podwzgórzu oraz *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa szczurów obu płci w różnych punktach rozwojowych.

### III MATERIAŁY I METODY

Niniejsza rozprawa doktorska powstała na bazie dwóch eksperymentów.

#### 3.1. Przebieg eksperymentu 1

Eksperyment prowadzono na sześciu 2-miesięcznych samicach szczura Wistar ( $300 \pm 13$  g) oraz trzech 2-miesięcznych samcach szczura Wistar. Zwierzęta pozyskano z hodowli zwierząt doświadczalnych w Poznaniu. Eksperyment otrzymał zgody Lokalnej Komisji Etycznej (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, zgody nr. 55/2018; 38/2020). Zwierzęta utrzymywano w klatkach na podkładzie z trocin w stałych warunkach cyklu dnia i nocy 12/12 godzin, w temperaturze 21°C. Szczury podczas całego eksperymentu miały stały dostęp do wody oraz pokarmu. Po tygodniowej aklimatyzacji szczurzyce rozdzielono do dwóch grup: 1) dieta kafeteryjna (KAF; n=3) oraz 2) dieta kontrolna (K; n=3); utrzymywane na standardowej diecie laboratoryjnej AIN93G (Zoolab, Polska) (**Ryc. 4**). Samice szczurów karmione były odpowiednio KAF lub K przez cztery tygodnie przed ciążą oraz w trakcie trwania ciąży i laktacji. Zwierzęta KAF otrzymywały dietę składającą się z produktów ogólnodostępnych w sklepach spożywczych (**Tabela 1**). Po czterech tygodniach podawania KAF lub K dokonano kojarzeń. W tym czasie szczury utrzymywane były w klatkach półmetabolicznych z drucianym dnem. Ciąża potwierdzana była przez obecność 4-6 czopów. Po zapłodnieniu samice szczurów utrzymywane były pojedynczo w klatkach na podłożu z trocin. W trakcie ciąży i laktacji samice miały stały dostęp do materiału gniazdowego (**Ryc. 4**).



#### Rycina 4. Przebieg eksperymentu 1

Po 4 tygodniach żywienia dietą kafeteryjną (KAF) lub kontrolną (K;) dorosłe samice szczurów kojarzono z samcami (n=3/grupa). Podawanie diety KAF było kontynuowane w czasie ciąży i laktacji do 25 dnia postnatalnego (PND 25).

##### 3.1.1. Dieta kafeteryjna (KAF)

Skład KAF został skomponowany na potrzeby tego eksperymentu w oparciu o publikacje wykorzystujące ten typ diety (17, 23). Dieta składała się z 12 różnych produktów: żółty ser, kabanosy, ciastka, czekolada, krem orzechowy, chipsy, herbatniki, dżem, pasztet, batony czekoladowe, suszone banany oraz muffiny (**Tabela 1**). Każda z samic z grupy KAF codziennie otrzymywała taką samą ilość trzech różnych produktów (dwa słodkie i jeden wytrawny). Porcje jedzenia odmierzane były na wadze laboratoryjnej. Pozostałości porcji jedzenia z poprzedniego dnia były usuwane z klatki i ważone w celu określenia spożycia pokarmu przez matki z grupy KAF oraz K. Dobowe spożywanie pokarmu przez matki było określane jako różnica wagi podawanej porcji pokarmu z dnia poprzedniego i pozostałości jedzenia dnia następnego (przed podaniem świeżej porcji pokarmu).

**Tabela 1.** Wartość odżywcza produktów diety kafeteryjnej stosowanej w eksperymentach w przeliczeniu na 100g produktu.

Produkty	Producent	Wartość energetyczna (kcal)	Tłuszcz (g)	Węglowodany (g)	Białko (g)	Sól (g)
Ser żółty	Mlepol	347,0	27,0	0,0	26,0	1,2
Kabanosy	Tarczyński	538	47,0	4,8	24,0	3,1
Herbatniki	Krakuski	440,0	13,0	71,0	8,9	1,1
Czekolada	E, Wedel	501,0	28,0	52,0	6,0	0,1
Masło orzechowe	Nusskati	563,0	37,0	49,0	6,5	0,1
Chipsy	Lays	536,0	33,0	52,0	5,9	1,1
Ciasteczka	E, Wedel	358,0	7,0	70,0	3,2	0,2
Pasztet	Duda	259,0	23,0	3,2	9,8	1,9
Dżem	Łowicz	142,0	0,5	35,0	0,5	0,0
Batoniki	Nestle	488,0	21,6	68,5	4,1	0,5
Suszone banany	Bakalland	530,0	34,0	50,0	2,0	0,0
Muffiny		431,0	24,0	47,0	6,1	0,6

### 3.1.2. Badanie składu ciała „matek” szczurzych

Samice z obu grup (KAF oraz K) raz w tygodniu (oprócz okresu ciąży i laktacji) poddane zostały analizie przy pomocy jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR – ang. Nuclear magnetic resonance; Minispec LF90; Billerica, Massachusetts, USA). Jest to nieinwazyjna technika mająca na celu zbadanie analizy składu ciała zwierzęcia. Badanie trwa ok 30 sek. i nie wymaga podawania środków anestetycznych. Z danych uzyskanych z badania składu ciała obliczono procentową zawartość tkanki tłuszczowej zwierząt.

### 3.1.3. Badanie z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI)

Po czterech tygodniach podawania diety matki z grup KAF i K zostały poddane badaniu MRI. Eksperyment MRI przeprowadzono przy użyciu przedklinicznego skanera poziomego pracującego z częstotliwością 9,4 T (400 MHz - Agilent), wyposażonego

w system gradientowy 600 mT/m. Do obrazowania użyto 72-mm cewki kwadrupolowej typu birdcage. Podczas eksperymentu MRI zwierzęta umieszczano w specjalnie zaprojektowanych uchwytach i znieczulano 1,5-2% izofluranem w mieszaninie 50/50 powietrze-tlen. Temperatura zwierząt utrzymywana była na poziomie 37°C. Oddech zwierzęcia był monitorowany i wykorzystywany do synchronizacji eksperymentów MRI. Obrazy MRI o gęstości spinowej zbierano w lokalizacji tkanki tłuszczowej techniką szybkiego echa spinowego (FSEMS) o parametrach: TR=5s, efektywny TE=10 ms, ETL = 8, FOV 62 x 62 mm, rozmiar matrycy 256x256, 18 plasterków. Następnie w tej samej lokalizacji zastosowano sekwencję FSEMs z dodatkowym nasyceniem tłuszczu. Zebrane dane z i bez sygnału tłuszczowego transformowano do formatu DICOM, a uzyskane obrazy z drugiego eksperymentu odejmowano od zebranych obrazów za pomocą oprogramowania ImageJ. Z kolei za pomocą programu Volumest (ImageJ plugin) zliczano objętość tkanki tłuszczowej dla każdego zwierzęcia w trzech niezależnych próbach. Badania z wykorzystaniem obrazowania rezonansem magnetycznym były przeprowadzone we współpracy z Centrum Nanobiomedycznym UAM w Poznaniu.

#### **3.1.4. Potomstwo**

Potomstwo urodziło się pomiędzy 22 a 23 dniem ciąży i w trzecim dniu po urodzeniu było ważone na wadze laboratoryjnej oraz zostało sprawdzone pod względem płci. Płeć określona została na podstawie odległości pomiędzy odbytem a ujściem cewki moczowej. W trzecim dniu po urodzeniu wszystkie mioty zostały ujednoczone do 8 osobników. W 25 dniu po urodzeniu u potomstwa zostało przeprowadzone badanie składu ciała. Określona została masa ciała, całkowita masa tkanki tłuszczowej, masa beztłuszczowa oraz zawartość wolnych płynów w ciele.

#### **3.1.5. Pobieranie materiału**

W tym samym dniu potomstwo zostało poddane eutanazji przy pomocy komory CO<sub>2</sub> (Equipment Veterinaire Minerve, Esternay, France). Zwierzęta zdekapitowano, pobrano krew, a po jej odwirowaniu uzyskano surowicę, którą zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do dalszych analiz. Ze względu na niewielką ilość pozyskanej surowicy, została ona połączona z osobników z tej samej grupy badawczej (n= 5/płeć/grupa). Od zwierząt pobrano również tkanki (mózg, wątrobę, trzustkę, okołonarządową tkankę tłuszczową oraz gonady) do dalszych analiz. Tkanki zostały od razu zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w -80°C.

### **3.1.6. Ocena profilu metabolicznego potomstwa**

Poziom glukozy został określony przy pomocy urządzenia do pomiaru glukozy AccuCheck Active (Roche Diabetes Care, Warszawa, Polska) we krwi pobranej z końcówki ogona. Poziom insuliny w surowicy krwi był zbadany przy pomocy radioimmunologicznego testu (Rat insulin RIA test RI-13K, Merck). Poziom trójglicerydów oraz cholesterolu w surowicy krwi został zmierzony przy pomocy testów enzymatycznych (Pointe Scientific, Warszawa, Polska). Analizy wykonano zgodnie z protokołem producenta.

### **3.1.7. Ocena profilu immunologicznego potomstwa**

W związku z tym, że KAF prowadzi do powstawania stanu zapalnego dokonano analizy profilu immunologicznego badając poziomy interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 10 (IL-10) oraz czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) w surowicy krwi przy pomocy testów immunoenzymatycznych ELISA (Elabscience, Wuhan, Hubei, Chiny). Analizy wykonano zgodnie z protokołem producenta.

### **3.1.8. Analiza poziomu transkrypty *Kiss1*, *Gpr54*, *Tac2*, *Pdyn* oraz *Sirt1***

#### **w podwzgórzcu oraz *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa**

Relatywny poziom transkrypty dla genów kodujących kisspeptynę (*Kiss1*), receptor dla kisspeptyny (*Gpr54*), sirtuinę (*Sirt1*), neurokininę B (*Tac2*) oraz dynorfinę (*Pdyn*) był oznaczony w podwzgórzcu potomstwa obu płci. W wątrobie potomstwa zmierzono poziom transkrypty dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1*. RNA z podwzgórza izolowane było trizolem (Roche) zgodnie ze standardowym protokołem, natomiast RNA z wątroby izolowane było przy pomocy zestawu RNesy Mini Kit (Qiagene). Ilość oraz czystość wyizolowanego RNA sprawdzono na urządzeniu NanoDrop (ThermoFisher Scientific). Następnie 1  $\mu$ l RNA został w procesie odwrotnej transkrypcji przepisany na cDNA przy pomocy zestawu do syntezy cDNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche). Przeprowadzono rt-PCR w duplikatach przy wykorzystaniu aparatury Light Cycler 480 II (Roche) przy pomocy zestawu Light Cycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche). Względny poziom mRNA badanych genów określono ilościowo metodą drugiej pochodnej maksymalnej (Roche), a wyniki znormalizowano do średniej geometrycznej ekspresji *Hprt* i *Thp* jako genów referencyjnych (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Sekwencje starterów wykorzystanych w badaniach PCR

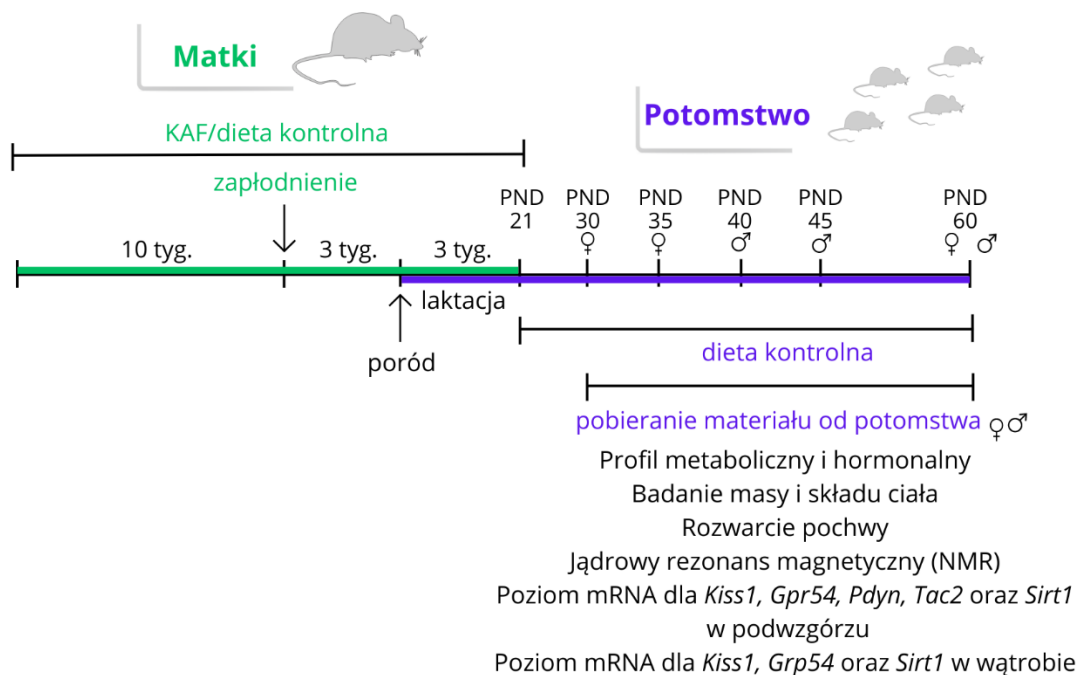
<b>Gen</b>	<b>Sekwencja starterów</b>	<b>Wielkość amplikonu (bp)</b>
<i>Kiss1</i>	F: 5' ATGATCTCGCTGGCTTCTTG R: 5' CCAGGCATTAACGAGTTCCT	141
<i>Gpr54</i>	F: 5' ACATGTGCCACTTTGACAGC R: 5' GAACCCACCCAGATGCTAAG	125
<i>Sirt1</i>	F: 5' CAGTGAGAAAATGCTGGCCTA R: 5' TGCCACTGTCCTGTTACTGC	180
<i>Tac2</i>	F: 5' CCTCAGCTTGGCATGGAC R: 5' GGGTGGAGGTAGCAGAGAGA	100
<i>Pdyn</i>	F: 5' TTGTGTTCCCTGTGTGCAGT R: 5' AGAGGCAGTCAGGGTGAGAA	150
<i>Hprt</i>	F: 5' CAGTCAACGGGGGACATAAAAG R: 5' ATTTTGGGGCTGTACTGCTTGA	146
<i>Tbp</i>	F: 5' ATCCTTCACCAATGACTCCTATG R: 5' ATGATGACTGCAGCAAACC	190

### 3.1.9. Analiza statystyczna

Do analizy danych dotyczących masy ciała, zawartości tkanki tłuszczowej oraz spożycia pokarmu matek użyto testu analizy wariancji (ANOVA) dla czynników grupy (KAF i K). Różnice pomiędzy grupami w procentowej zawartości tkanki tłuszczowej u matek, masie ciała potomstwa, procentowej zawartości tkanki tłuszczowej u potomstwa, profilu metabolicznym i immunologicznym oraz w poziomach mRNA zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu testu *t-studenta*. Dla pomiarów objętości tkanki tłuszczowej wykonanych przy pomocy MRI zastosowano program ImageJ (Volumest, ImageJ). Wykresy zostały przygotowane w programie Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA). Dane prezentowane są jako średnia  $\pm$  SEM. Wartość *p* mniejsza niż 0,05 uznana została za statystycznie istotną. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA).

### 3.2. Przebieg eksperymentu 2

Dziesięć 2-miesięcznych samic szczura szczepu Wistar ( $200\text{g} \pm 20\text{g}$ ) oraz pięć 2-miesięcznych samców szczura szczepu Wistar zakupiono z licencjonowanej hodowli zwierząt doświadczalnych w Poznaniu (Centrum Zaawansowanych Technologii UAM w Poznaniu). Zwierzęta utrzymywane były w klatkach, w stałych warunkach dnia i nocy (12/12 godzin) w temperaturze  $21^{\circ}\text{C}$ . Szczury miały stały dostęp do standardowej diety laboratoryjnej (AIN93G, Zoolab, Polska) oraz wody. Po tygodniu aklimatyzacji samice były losowo przypisane do grup: utrzymywanych na diecie kafeterijnej (KAF;  $n=5$ ) oraz utrzymywanych na diecie kontrolnej (K;  $n=5$ ; standardowa dieta laboratoryjna AIN93G). Samice obu grup otrzymywały dietę KAF lub K, przez 10 tygodni przed ciążą, w trakcie ciąży oraz w trakcie laktacji. Po 10 tygodniach podawania diety samice obu grup zostały skojarzone z samcami. Każda para była utrzymywana przez dwa dni w klatkach pół-metabolicznych z drucianym dnem. Obecność czopów waginalnych była wskaźnikiem potwierdzającym ciążę. Po zapłodnieniu samice przebywały pojedynczo w klatkach ze stałym dostępem do pokarmu i wody. Samice z grupy KAF przez cały okres trwania eksperymentu nie miały dostępu do standardowej diety laboratoryjnej (**Rycina 5**). Eksperyment przeprowadzono w oparciu o zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (nr zgody 55/2018).





## **Rycina 5. Przebieg eksperymentu 2**

Po 10 tygodniach żywienia dietą kafeteryjną (KAF) lub kontrolną (K) dorosłe samice szczurów kojarzono z samcami w celu zapłodnienia (n=5/grupa). Podawanie diety KAF było kontynuowane w czasie ciąży i laktacji do 21 dnia postnatalnego (PND 21). Od PND 21 potomstwo utrzymywane było na diecie kontrolnej do PND 60. Pobieranie materiału od potomstwa następowało od PND 30 do PND 60.

### **3.2.1. Dieta kafeteryjna (KAF)**

Zwierzęta otrzymały KAF składająca się z produktów zawartych w **tabeli 1**. Tak jak w pierwszym eksperymencie, samice z grupy KAF otrzymywały codziennie taką samą ilość trzech produktów (dwóch słodkich i jednego wytrawnego). Produkty te były codziennie zmieniane (**Tabela 1**).

### **3.2.2. Badanie składu ciała „matek” szczurzych**

Matki z obu grup były ważone raz w tygodniu. Dodatkowo trzy raz w trakcie trwania eksperymentu przeanalizowano skład ciała matek w celu oszacowania procentowej zawartości tkanki tłuszczowej. Pomiarów dokonano w trzecim, ósmym i dziewiątym tygodniu ekspozycji na dietę. Pomiarów nie prowadzono w trakcie ciąży i laktacji, aby uniknąć dodatkowego stresora.

### **3.2.3. Potomstwo**

Potomstwo urodziło się pomiędzy 22 a 25 dniem ciąży. W 4 dniu po urodzeniu potomstwo było ważone na wadze laboratoryjnej oraz zostało sprawdzone pod względem płci. Płeć określano na podstawie odległości pomiędzy odbytem a ujściem cewki moczowej. W 4 dniu po urodzeniu mioty były ujednolicane do 10 osobników (jeśli było to możliwe). Trzy mioty (dwa KAF i jeden K) liczyły po 9 osobników. W 21 dniu po urodzeniu potomstwo zostało odstawione od matek, zważone i było utrzymywane na standardowej diecie laboratoryjnej (AIN93G, Zoolab, Polska) do końca eksperymentu. Dodatkowo u samic z obu grup, KAF oraz K, monitorowany był zewnętrzny marker dojrzewania płciowego jakim jest otwarcie pochwy.

### **3.2.4. Badanie składu ciała**

Potomstwo przed eutanazją było ważone, a także analizowane pod względem składu ciała, aby oszacować zawartość: procentowej zawartości tkanki tłuszczowej, tkanki tłuszczowej (g), beztłuszczowej masy ciała (g) oraz wolnych płynów w organizmie (g).

### **3.2.5. Pobieranie materiału**

Pobieranie tkanek oraz surowicy krwi do dalszych badań odbywało się w trzech punktach czasowych. Dla samic były to następujące dni po urodzeniu: PND 30, PND 35 oraz PND 60. Natomiast dla samców były to: PND 40, PND 45 oraz PND 60. W każdym z wyżej wymienionych punktów czasowych 1/3 potomstwa poddawano eutanazji przy pomocy komory z CO<sub>2</sub>, a następnie dekapitowano. Samice w 60 dniu po urodzeniu były poddane eutanazji w fazie diestrus cyklu rujowego. Faza cyklu potwierdzona została wymazami z pochwy. Wymazy z pochwy pobierano w godzinach porannych w oparciu o kryteria ustalone przez Goldman i wsp. (89). Preparaty uzyskane z wymazów oceniane były przy pomocy mikroskopu świetlnego DM 500 (Leica, Wetzlar, Niemcy). Od potomstwa pobrano następujące tkanki: korę mózgową, hipokamp, podwzgórze, mózdzek, wątrobę, trzustkę, gonady, tłuszcz trzewny. Tkanki zostały natychmiastowo zamrożone na suchym lodzie, następnie przechowywano je w -80°C do późniejszych analiz.

### **3.2.6. Ocena profilu metabolicznego i hormonalnego potomstwa**

U potomstwa obu płci w pobranej surowicy krwi oznaczono poziomy: glukozy, insuliny, trójglicerydów, cholesterolu, oraz hormonu luteinizującego. Dodatkowo u potomstwa oznaczono poziom estradiolu (samice), testosteronu (samce).

Poziomy metabolitów i hormonów surowicy krwi potomstwa były mierzone przy pomocy następujących testów:

Metabolity/hormony	Test i dostawca
Glukoza	Test enzymatyczny (Pointe Scientific, Warszawa, Polska).
Trójglicerydy	Test enzymatyczny (Pointe Scientific, Warszawa, Polska).
Cholesterol	Test enzymatyczny (Pointe Scientific, Warszawa, Polska).
Insulina	Test immunoenzymatyczny ELISA (Fine Test Biotech Co., Wuhan, Chiny).
Estradiol	Test immunoenzymatyczny ELISA (Crystal Chem, Illinois, USA).
Testosteron	Test immunoenzymatyczny ELISA (LDL Labor Diagnostika Nord GmbH, Nordhorn, Niemcy).
Hormon luteinizujący (LH)	Test immunoenzymatyczny ELISA (ReproPharm Vet, INRA, Nouzilly, Francja)

### 3.2.7. Analiza poziomu transkryptyu *Kiss1*, *Gpr54*, *Tac2*, *Pdyn* oraz *Sirt1* w podwzgórzcu oraz *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa

Relatywny poziom transkryptyu dla genów kodujących kisspeptynę (*Kiss1*), receptor dla kisspeptyny (*Gpr54*), sirtuinę (*Sirt1*), neurokininę B (*Tac2*) oraz dynorfinę (*Pdyn*) był oznaczony w podwzgórzcu potomstwa obu płci. W wątrobie potomstwa zmierzono poziom transkryptyu dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1*. RNA z podwzgórzca izolowane było trizolem (Roche) zgodnie ze standardowym protokołem, natomiast RNA z wątroby izolowane było przy pomocy zestawu RNesy Mini Kit (Qiagene). Ilość oraz czystość wyizolowanego RNA sprawdzono na urządzeniu NanoDrop (Thermofisher Scientific). Następnie 1 µl RNA został w procesie odwrotnej transkrypcji przepisany na cDNA przy pomocy zestawu do syntezy cDNA (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche).

Przeprowadzono rt-PCR w duplikatach przy wykorzystaniu aparatury Light Cycler 480 II (Roche) przy pomocy zestawu Light Cycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche). Względny poziom mRNA badanych genów określono ilościowo metodą drugiej pochodnej maksymalnej (Roche), a wyniki znormalizowano do średniej geometrycznej ekspresji *Hprt* i *Tbp* jako genów referencyjnych (**Tabela 2**).

### 3.2.8. Analiza statystyczna

Przyrosty masy ciała matek analizowano przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA dla powtarzających się parametrów (czynniki: grupa i wiek), a następnie testu Scheffego post-hoc. Masę ciała i procentową zawartość tkanki tłuszczowej analizowano przy użyciu dwuczynnikowej ANOVA, a następnie testu Scheffego post-hoc. Analizy wykonano przy użyciu oprogramowania Statistica, TIBCO Software Inc.. międzygrupowe różnice w składzie ciała: zawartość tkanki tłuszczowej (g), masa beztłuszczowa (g) i wolne płyny (g) zostały obliczone przy użyciu testu t (w programie GraphPad Software, San Diego, USA). Profile metaboliczne i hormonalne oraz poziom mRNA *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* i *Tac2* porównywano pomiędzy czynnikami grupowymi (K vs. KAF) w ramach czynnika czasu (30, 35 i 60 dzień w przypadku samic oraz 40, 45 i 60 dzień w przypadku samców) za pomocą uogólnionych liniowych modeli efektów mieszanych (GLMM) o rozkładzie gaussowskim, uwzględniających zależności pomiędzy osobnikami w miocie poprzez efekt losowy. Modele przeprowadzono osobno dla samic i samców. W przypadku uzyskania istotnych wyników dla zmiennej kategorycznej z GLMM, przeprowadzono test Tukeya, przy p-wartościach < 0,05. W celu oceny różnic w proporcji samic z rozwartą pochwą pomiędzy grupą KAF a grupą K zastosowano regresję beta. Odsetek samic z otwartą pochwą traktowano jako zmienną odpowiedzi po zastosowaniu małej transformacji liniowej w celu wyeliminowania zer i jedynek (90).

Analizy przeprowadzono w programie R 4.2.1 (R Core Developmental Team, 2022). GLMMs przeprowadzono przy użyciu pakietu lme4 (91). Wizualizacje danych wykonano przy użyciu pakietu ggplot2 (92).

Dane przedstawiono jako średnie  $\pm$  SEM. Wartości p poniżej 0,05 uznano za istotne statystycznie. Wykresy przygotowano przy użyciu oprogramowania Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, USA).

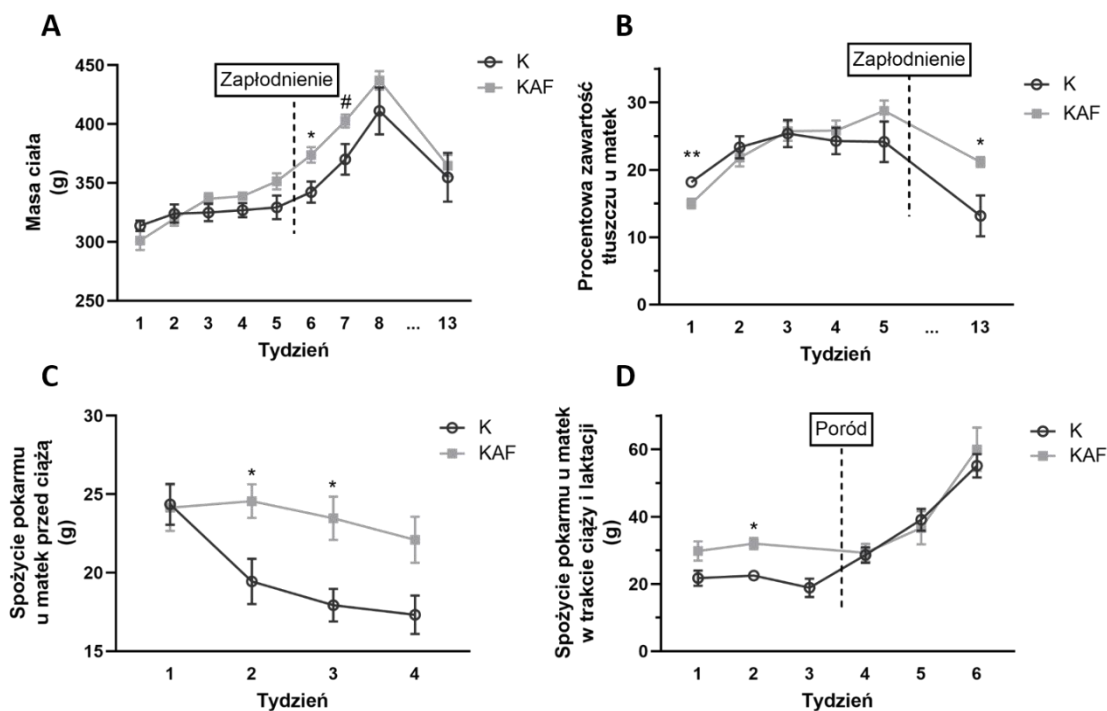
## IV WYNIKI

### 4.1. Eksperyment 1

#### 4.1.1. Matki: masa ciała, spożycie pokarmu i zawartość tkanki tłuszczowej

**KAF matek spowodowała zwiększone spożycie pokarmu w trakcie ciąży, natomiast nie wpłynęła na zmiany masy ciała i procentowej zawartości tkanki tłuszczowej.**

Analiza danych dotyczących masy ciała wykazała, że matki KAF w szóstym tygodniu podawania diety (pierwszy tydzień ciąży) miały wyższą masę ciała w porównaniu do matek z grupy K ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 6 A**). Podobny trend utrzymywał się w siódmym tygodniu podawania diety ( $\#p = 0,06$ ; **Ryc. 6 A**). Natomiast w pierwszym tygodniu podawania diet zaobserwowano, że matki z grupy KAF miały niższą procentową zawartość tkanki tłuszczowej w porównaniu do matek z grupy K ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 6 B**). Z kolei w trzynastym tygodniu podawania diety, matki z grupy KAF miały wyższą procentową zawartość tkanki tłuszczowej w porównaniu do matek z grupy K ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 6 B**). Zaobserwowano również istotną statystycznie różnicę w przyjmowaniu pokarmu przez matki w drugim i trzecim tygodniu podawania diety ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 6 C**). Matki utrzymywane na KAF wykazywały zwiększone spożycie pokarmu przed ciążą w porównaniu do grupy K. Dodatkowo w drugim tygodniu ciąży, matki KAF spożywały więcej pokarmu także w porównaniu do matek K ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 6 D**).

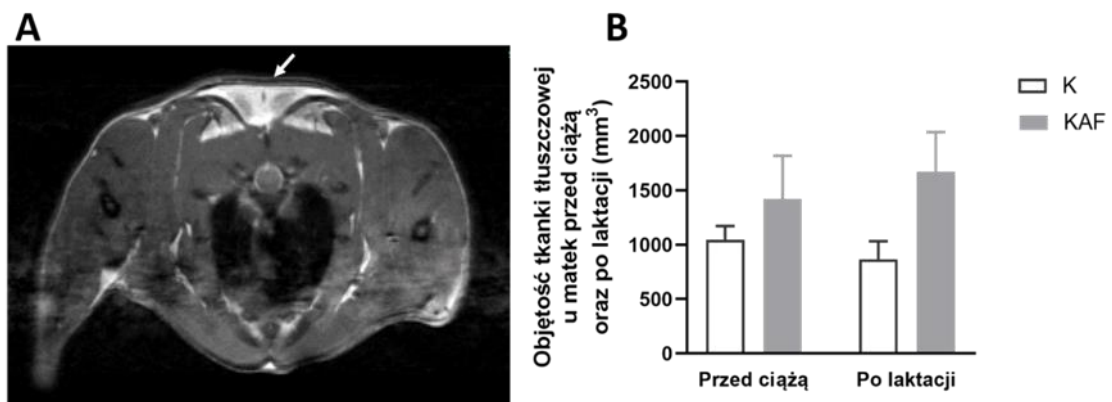


**Rycina 6.** Masa ciała i procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie matki oraz spożycie pokarmu przez matki przed ciążą oraz w czasie ciąży i laktacji

(A) Masa ciała matek w tygodniowych punktach czasowych: przed ciążą, w trakcie ciąży i na koniec doświadczenia. W 6 tygodniu podawania diety matki KAF miały większą masę ciała ( $p < 0,05$ ). Trend ten utrzymywał się także w 7 tygodniu podawania diety ( $p = 0,06$ ). (B) Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej u matek mierzona była co tydzień przed ciążą i na koniec doświadczenia. Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej była wyższa u matek KAF w 1 i 13 tygodniu w porównaniu do grupy K (odpowiednio  $p < 0,01$  i  $p < 0,05$ ). (C) Rycina przedstawia średnie tygodniowe spożycie pokarmu przed ciążą w grupach KAF i K. W 2 i 3 tygodniu matki KAF miały wyższe spożycie pokarmu ( $p < 0,05$ ) w porównaniu z grupą K. (D) Rycina przedstawia średnie tygodniowe spożycie pokarmu w czasie ciąży i laktacji. W 2 tygodniu matki KAF miały istotnie wyższe spożycie pokarmu w porównaniu z grupą K ( $p < 0,05$ ). Szary kwadrat - samice żywione dietą kafeterijną (KAF), czarna kropka - samice żywione dietą kontrolną (K);  $n = 3$ /grupa. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; # $p = 0,06$ );  $n = 3$ /grupa; statystyka KAF vs. K wg testu *t*.

#### 4.1.2. Wpływ KAF na objętość między łopatkowej tkanki tłuszczowej – badanie przy pomocy MRI

**Rycina 7 A** przedstawia przykładowy skan z rezonansu magnetycznego pochodzący od matki z grupy K. Strzałka wskazuje badany obszar tkanki tłuszczowej. Pomiary objętości tkanki tłuszczowej przeprowadzono przed okresem ciąży oraz po okresie laktacji u matek z grup KAF oraz K. Analiza danych ze skanów MRI nie wykazała różnic w objętości międzyłopatkowej tkanki tłuszczowej u grup matek KAF i K przed ciążą ( $p=0,42$ ) oraz po okresie laktacji ( $p=0,12$ ; **Ryc. 7 B**).



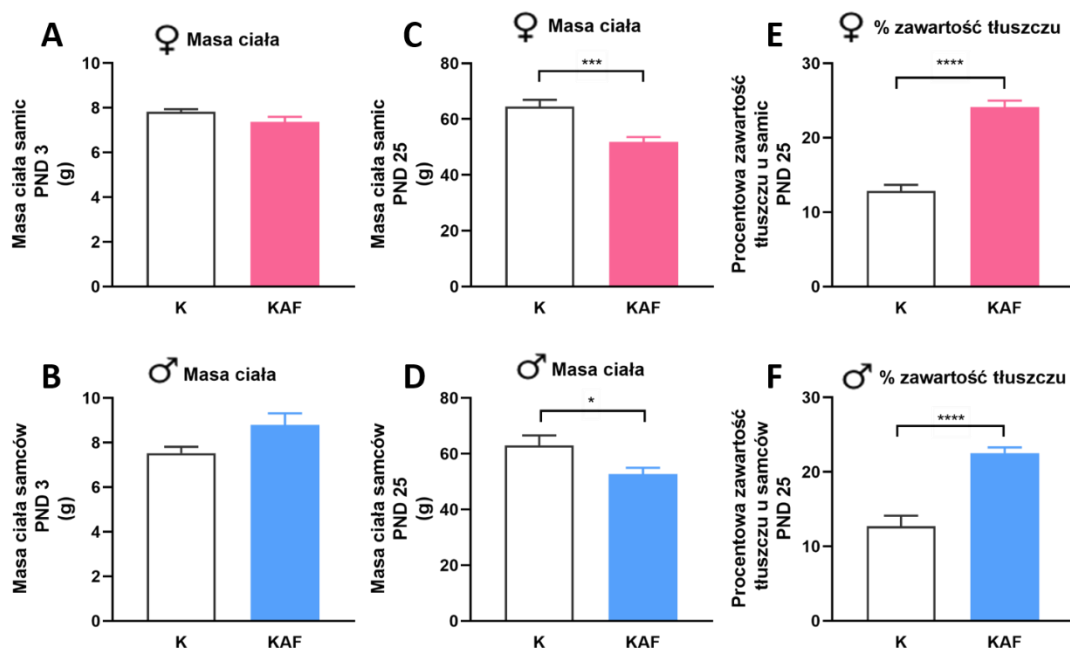
**Rycina 7.** Obraz przedstawiający skan z rezonansu magnetycznego obrazujący tkankę tłuszczową

(A) Reprezentatywny obraz z rezonansu magnetycznego z grupy K. Biała strzałka wskazuje obszar pomiaru tkanki tłuszczowej. (B) Objętość tkanki tłuszczowej mierzona przed ciążą i po laktacji; przed ciążą ( $p= 0,42$ ), po laktacji ( $p= 0,12$ );  $n= 3$ /grupa; statystyka KAF vs K wg *testu t*.

#### 4.1.3. Badanie masy i składu ciała potomstwa

KAF matki nie wpłynęła na masę ciała potomstwa w PND 3 (**Ryc. 8 A i B**), natomiast w PND 25 zarówno samice, jak i samce od matek utrzymywanych na KAF miały niższą masę ciała w porównaniu do grupy K. Dodatkowo, zaobserwowano płciowo-specyficzny wpływ KAF na masę ciała potomstwa. Samice z grupy KAF ważyły o 20 % mniej niż samice z grupy K (KAF: 51,8 g  $\pm$  2,9; K: 64,4 g  $\pm$  2,9;  $p < 0,001$ ;  $n = 9-13$ ; **Ryc. 8 C**). Natomiast samce z grupy KAF ważyły 16 % mniej niż samce z grupy K (KAF: 52,7 g  $\pm$  4,0; K: 63,0 g  $\pm$  4,0;  $p < 0,05$ ;  $n = 7-10$ ; **Ryc. 8 D**).

Analiza danych z pomiarów składu ciała wykazała różnice w procentowej zawartości tkanki tłuszczowej u potomstwa w PND 25. Zarówno samice, jak i samce z grupy KAF charakteryzowały się wyższą procentową zawartością tkanki tłuszczowej (samice KAF: 24,1 %  $\pm$  1,3; samice K: 12,8 %  $\pm$  1,3;  $n = 9-13$ ; samce KAF: 22,5 %  $\pm$  1,5; samce K: 12,7 %  $\pm$  1,5;  $n = 7-10$ ;  $p < 0,001$ ; **Ryc. 8 E i F**).



**Rycina 8.** Masa ciała potomstwa w PND 3 (A, B) i PND 25 (C, D) oraz procentowa zawartość tkanki tłuszczowej (E, F) u potomstwa w PND 25

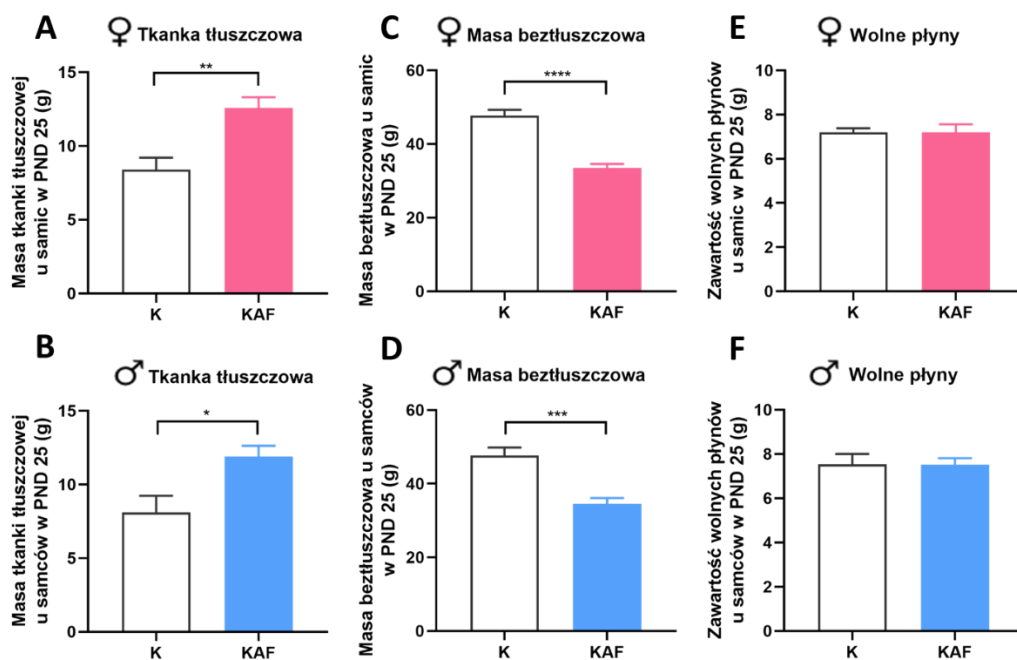
(A) Masa ciała samic w PND 3 w grupach KAF i K ( $p$ 's=0,11). (B) Masa ciała samców w PND 3 w grupach KAF i K ( $p$ 's=0,11). (C) masa ciała samic w PND 25 w grupach



KAF i K (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; samice  $n = 9-13$ /grupa). (D) Masa ciała samców w dniu PND 25 w grupach KAF i K (\*  $p < 0,05$ ; samce  $n = 7-10$ /grupa). (E) Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej u samic w PND 25 (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ; samice  $n = 9-13$ /grupa). (F) Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej u samców w PND 25 (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ; samce  $n = 7-10$ /grupa); K - grupa kontrolna, KAF - grupa kafeteryjna; statystyka KAF vs K wg *testu t*.

Samice z grupy KAF w PND 25 charakteryzowały się wyższą zawartością tkanki tłuszczowej w porównaniu do grupy K ( $p < 0,01$ ;  $n = 9-13$ ; **Ryc. 9 A**). Dodatkowo, zaobserwowano niższą masę beztłuszczową u samic z grupy KAF w porównaniu do samic z grupy K ( $p < 0,001$ ;  $n = 9-13$ ; **Ryc. 9 C**). Analiza danych dotycząca zawartości wolnych płynów w organizmie nie wykazała różnic pomiędzy grupami w samic ( $p = 0,10$ ;  $n = 9-13$ ; **Ryc. 9 E**).

Podobnie jak w przypadku samic, u samców z grupy KAF w PND 25 zaobserwowano wyższą zawartość tkanki tłuszczowej w porównaniu do grupy K, jednak różnice były mniejsze niż u samic ( $p < 0,05$ ;  $n = 7-10$ ; **Ryc. 9 B**). Samce z grupy KAF w PND 25, podobnie jak samice, charakteryzowały się niższą masą beztłuszczową w porównaniu do samców grupy K ( $p < 0,005$ ;  $n = 7-10$ ; **Ryc. 9 D**). Tak jak w przypadku samic, u samców nie zaobserwowano różnic w zawartości wolnych płynów w organizmie ( $p = 0,97$ ;  $n = 7-10$ ; **Ryc. 9 F**).



**Rycina 9.** Badanie składu ciała potomstwa

Średnie wartości: tkanki tłuszczowej (g) u samic (A) i samców (B); masy beztłuszczowej (g) u samic (C) i samców (D); wolnych płynów (g) u samic (E) i samców (F). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; K – grupa kontrolna, KAF - grupa kafeteryjna;  $n = 9-13$  dla samic;  $n = 7-10$  dla samców.

#### **4.1.4. KAF matki w sposób płciowo-zależny wpływa na parametry metaboliczne potomstwa w 25 dniu po urodzeniu**

##### **Głukoza**

Samice pochodzące od matek utrzymywanych na KAF miały o 14,5 % wyższe stężenie glukozy we krwi w porównaniu do grupy K (KAF: 141,8 mg/dl  $\pm$  7,5; K: 123,8 mg/dl  $\pm$  7,5;  $p < 0,05$ ; **Ryc. 10 A**). Z drugiej strony, u samców nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w stężeniu glukozy we krwi pomiędzy grupami w PND 25 (KAF: 143,8 mg/dl  $\pm$  9,1; K: 126,0 mg/dl  $\pm$  9,1). Wskazano natomiast trend wzrostowy w stężeniu glukozy u grupy KAF w porównaniu z grupą K ( $p = 0,07$ ;  $n = 5$ /grupa/płeć; **Ryc. 10 B**).

##### **Insulina**

Zarówno u samic, jak i samców pochodzących od matek utrzymywanych na KAF zaobserwowano wyższe stężenie insuliny w osoczu krwi w porównaniu do grup K. Dodatkowo, różnice te były większe w przypadku samic z grupy KAF, u których stężenie tego hormonu było 8 razy wyższe niż u samic z grupy K (KAF: 2,4 ng/mL  $\pm$  0,3; K: 0,3 ng/mL  $\pm$  0,3;  $p < 0,005$ ;  $n = 5$ /grupa/płeć; **Ryc. 10 C**). Natomiast u samców z grupy KAF stężenie insuliny w osoczu krwi było 4,5 razy wyższe niż u samców z grupy K (KAF: 1,8 ng/mL  $\pm$  0,3; K: 0,4 ng/mL  $\pm$  0,3;  $p < 0,01$ ;  $n = 5$ /grupa/płeć; **Ryc. 10 D**).

##### **Cholesterol**

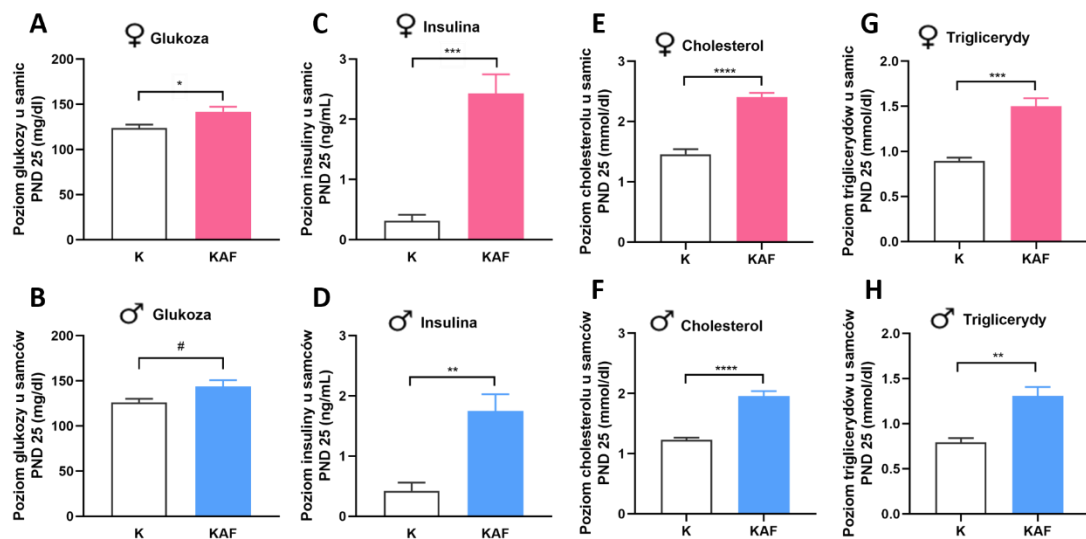
U samic z grupy KAF w PND 25 zaobserwowano wyższy poziom cholesterolu w surowicy krwi w porównaniu do grupy K ( $p < 0,001$ ; **Ryc. 10 E**). Poziom cholesterolu samic w grupie KAF był 1,6 razy wyższy niż w grupie K (KAF: 2,4 mmol/dl  $\pm$  0,1; K: 1,5 mmol/dl  $\pm$  0,1;  $n = 5$ /grupa/płeć).

Podobnie u samców z grupy KAF wykazano wyższy poziom cholesterolu w PND 25 w porównaniu z grupą K ( $p < 0,001$ ; **Ryc. 10 F**). U samców z grupy KAF zaobserwowano o ponad 1,5 razy wyższy poziom cholesterolu w surowicy krwi w porównaniu do grupy K (KAF: 1,9 mmol/dl  $\pm$  0,09; K: 1,2 mmol/dl  $\pm$  0,09;  $n = 5$ /grupa/płeć).

## Trójglicerydy

Podobnie jak w przypadku cholesterolu, u samic z grupy KAF w PND 25 zaobserwowano wyższe stężenie trójglicerydów w porównaniu z grupą K ( $p < 0,005$ ; **Ryc. 10 G**). Samice z grupy KAF charakteryzowały się o 1,6 razy wyższym poziomem trójglicerydów w stosunku do grupy K (KAF: 1,5 mmol/dl  $\pm$  0,1; K: 0,9 mmol/dl  $\pm$  0,1;  $n = 5$ /grupa/płeć).

U samców z grupy KAF w PND 25 również wykazano podwyższone stężenie trójglicerydów w surowicy krwi w porównaniu do grupy K ( $p < 0,01$ ; **Ryc. 10 H**). Poziom trójglicerydów u samców z grupy KAF był o 1,6 razy wyższy w porównaniu z grupą K (KAF: 1,3 mmol/dl  $\pm$  0,1; K: 0,8 mmol/dl  $\pm$  0,1;  $n = 5$ /grupa/płeć).



**Rycina 10.** Status metaboliczny u potomstwa w dniu PND 25

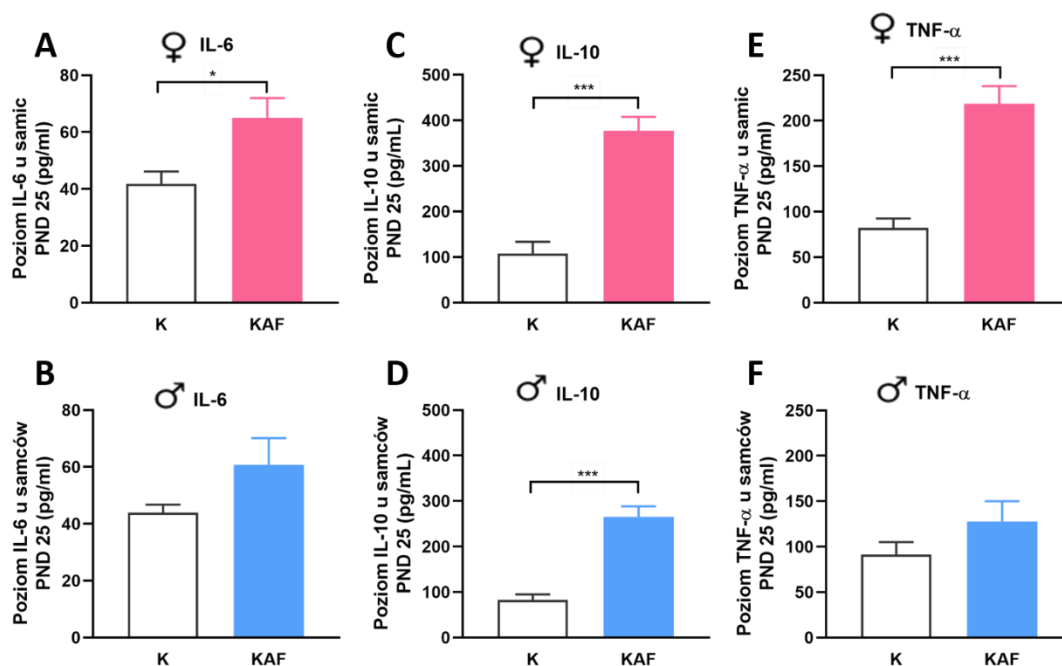
(A) Poziom glukozy we krwi u samic (\*  $p < 0,05$ ). (B) Poziom glukozy we krwi u samców (#  $p = 0,07$ ). (C) Poziom insuliny w surowicy krwi u samic (\*\*\*)  $p < 0,005$ ). (D) Poziom insuliny w surowicy krwi u samców (\*\*  $p < 0,01$ ). (E) Poziom cholesterolu w surowicy krwi u samic (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ). (F) Poziom cholesterolu w surowicy krwi u samców (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ). (G) Poziom trójglicerydów w surowicy krwi u samic (\*\*\*)  $p < 0,005$ . (H) Poziom trójglicerydów w surowicy krwi u samców (\*\*  $p < 0,01$ ). K – grupa kontrolna, KAF – grupa kafeterijna; PND 25 – 25 dzień po urodzeniu;  $n = 5$ /sex/grupę; statystyka KAF vs. K wg testu *t*.

#### 4.1.5. KAF matki powoduje zależne od płci zmiany w profilu immunologicznym potomstwa w PND 25

Analiza danych dotyczących profilu immunologicznego, potwierdzającego występowanie stanu zapalnego, wykazała zależny od płci wpływ KAF na poziom IL-6, IL-10 oraz TNF- $\alpha$  u potomstwa w PND 25. U samic z grupy KAF stężenie IL-6 w surowicy krwi było 1,6 razy wyższe w porównaniu z grupą K (KAF: 65,0 pg/ml  $\pm$  8,3; K: 41,8 pg/ml  $\pm$  8,3;  $p < 0,05$ ; **Ryc. 11 A**). Natomiast w przypadku samców nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniu IL-6 w osoczu krwi (KAF: 60,7 pg/ml  $\pm$  9,8; K: 43,9 pg/ml  $\pm$  9,8;  $p = 0,12$ ; **Ryc. 11 B**).

W przeciwieństwie do stężenia IL-6, u obu płci potomstwa od matek utrzymywanych na KAF wykazano wyższy poziom IL-10 w surowicy krwi w porównaniu do grup K. U samic z grupy KAF zaobserwowano podwyższenie o 3,5 razy poziomu IL-10 w stosunku do samic z grupy K (KAF: 376,8 pg/ml  $\pm$  40,4; K: 107,8 pg/ml  $\pm$  40,4;  $p < 0,005$ ; **Ryc. 11 C**). Natomiast u samców z grupy KAF wykazano podwyższenie o 3,2 razy poziomu IL-10 w stosunku do grupy K (KAF: 265,6 pg/ml  $\pm$  28,3; K: 82,5 pg/ml  $\pm$  28,3;  $p < 0,005$ ; **Ryc. 11 D**).

Podobnie jak w przypadku analizy danych dotyczących poziomu IL-6, poziom TNF- $\alpha$  w surowicy krwi był wyższy u grupy samic z grupy KAF. Natomiast nie wykazano różnic istotnych statystycznie w przypadku samców. Poziom TNF- $\alpha$  u samic pochodzących od matek utrzymywanych na KAF były o 2,7 razy wyższy w porównaniu z grupą K (dla samic – KAF: 218,5 pg/ml  $\pm$  23,9, K: 82,3 pg/ml  $\pm$  23,9;  $p < 0,005$ ; dla samców – KAF: 127,8 pg/ml  $\pm$  26,1, K: 91,5 pg/ml  $\pm$  26,1;  $p = 0,2$ ;  $n = 5/\text{grupa}/\text{płeć}$ ; **Ryc. 11 E i F**).



**Rycina 11.** Markery stanu zapalnego u potomstwa w dniu PND 25

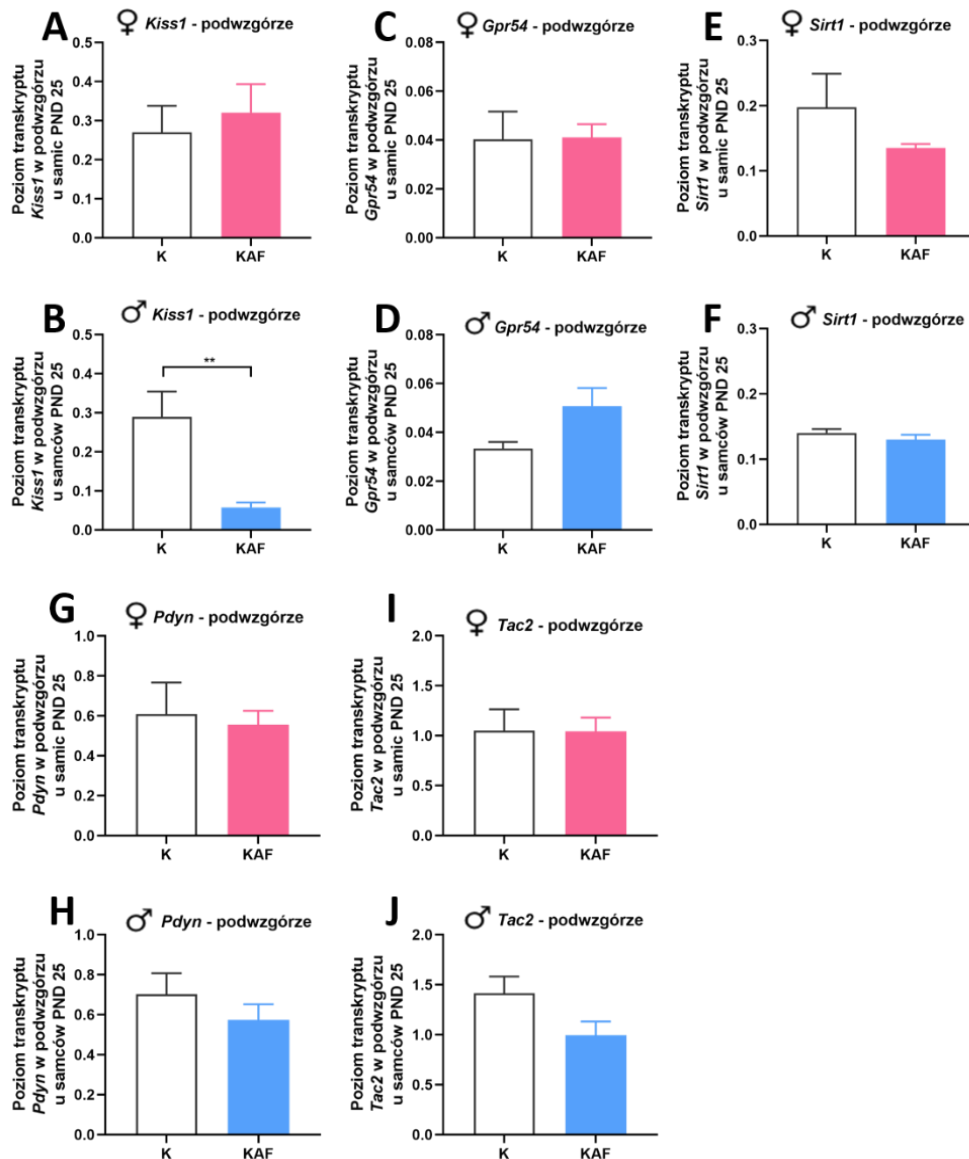
(A) Poziom interleukiny 6 (IL-6) u samic (\*  $p < 0,05$ ). (B) Poziom IL-6 u samców ( $p = 0,12$ ). (C) Poziom interleukiny 10 (IL-10) u samic (\*\*\*)  $p < 0,005$ . (D) Poziom IL-10 w surowicy krwi u samców (\*\*\*)  $p < 0,005$ . (E) Poziom czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ) u samic (\*\*\*)  $p < 0,005$ . (F) Poziom TNF- $\alpha$  u samców ( $p = 0,20$ ). K - grupa kontrolna, KAF - grupa kafeteryjna; PND 25 – 25 dzień po urodzeniu;  $n = 5/\text{sex}/\text{grupa}$  dla wszystkich pomiarów; statystyka KAF vs. K wg *testu t*.

#### 4.1.6. KAF matki w płciowo-zależny sposób wpływa na poziom transkryptu dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* oraz *Tac2* w podwzgórzu potomstwa

Analiza danych dotyczących poziomu transkryptu u samic nie wykazała różnic pomiędzy grupami KAF i K dla poziomów transkryptów *Kiss1* ( $p=0,64$ ), *Gpr54* ( $p=0,94$ ), *Sirt1* ( $p=0,16$ ), *Pdyn* ( $p=0,73$ ) oraz *Tac2* ( $p=0,98$ ) w podwzgórzu (**Ryc. 12 A, C, E, G i I**).

Natomiast u samców z grupy KAF w PND 25 zaobserwowano znacznie niższy poziom mRNA dla *Kiss1* ( $p<0,01$ ; **Ryc. 12 B**). U samców z grupy KAF poziom transkryptu dla *Kiss1* w podwzgórzu był 5 razy mniejszy w porównaniu do grupy K (KAF:  $0,06 \pm 0,06$ ; K:  $0,3 \pm 0,06$ ;  $n=5/\text{grupa}/\text{płeć}$ ). Jednakże, analiza danych poziomu transkryptu w podwzgórzu samców nie wykazała różnic dla pozostałych genów *Gpr54* ( $p=0,08$ ), *Sirt1* ( $p=0,34$ ), *Pdyn* ( $p=0,33$ ) oraz *Tac2* ( $p=0,07$ ) (**Ryc. 12 D, F, H i J**).

Przeanalizowano również stosunek poziomu transkrypcji *Sirt1/Kiss1* dla samic i samców. Wykazano, że stosunek ten był prawie 2 razy niższy u samic z grupy KAF w porównaniu do grupy K w PND 25 (K: 0,73; KAF: 0,42). Z drugiej strony, w przypadku samców w PND 25 wykazano, że stosunek mRNA dla *Sirt1/Kiss1* był ponad 4,5 razy wyższy w grupie KAF w porównaniu do grupy K (K: 0,49; KAF: 2,25). Wyniki te wskazują na występowanie różnic płciowych w zakresie badanego parametru.



**Rycina 12.** Poziom transkryptu mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* oraz *Tac2* potomstwa w podwzgórzu w PND 25

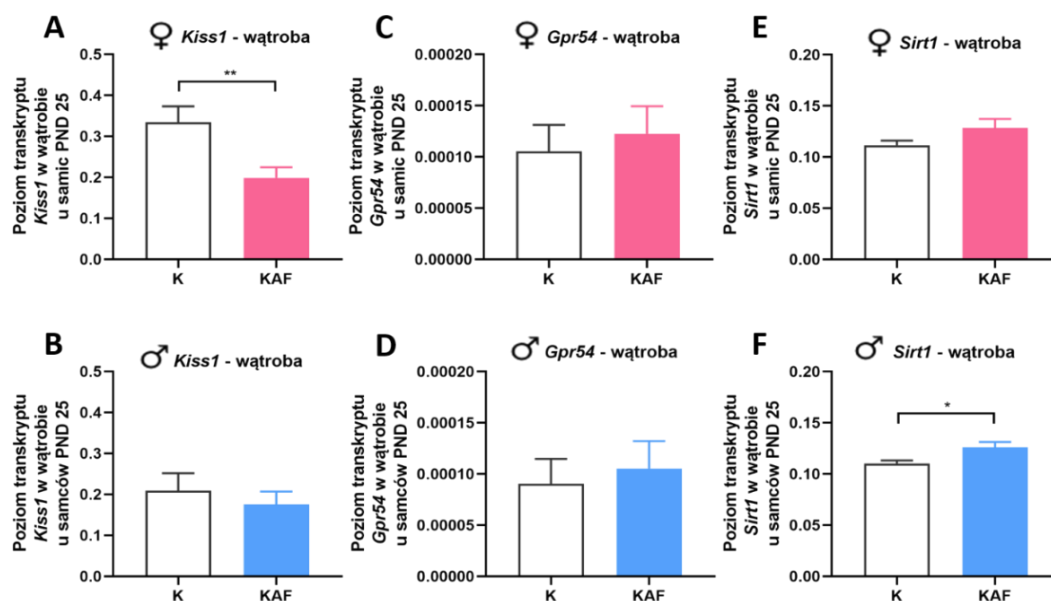
Poziom mRNA dla *Kiss1* u samic (A) i samców (B); poziom mRNA dla *Gpr54* u samic (C) i samców (D); poziom mRNA dla *Sirt1* u samic (E) i samców (F); poziom mRNA dla *Pdyn* u samic (G) i samców (H); poziom mRNA dla *Tac2* u samic (I) i samców (J); K – grupa kontrolna, KAF – grupa kafeteryjna; PND 25 – 25 dzień po urodzeniu; n= 9-13 dla samic; n= 7-10 dla samców; \*\* p<0,01.



#### 4.1.7. KAF matki wpływa w płciowo-zależny sposób na poziom transkryptu dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* w wątrobie potomstwa

U samic z grupy KAF zaobserwowano niższy poziom transkryptu dla *Kiss1* w wątrobie w porównaniu z grupą K ( $p < 0,01$ ; **Ryc. 13 A**). Poziom mRNA dla *Kiss1* w wątrobie u samic z grupy KAF był o 1,5 razy niższy niż w grupie K (KAF:  $0,2 \pm 0,05$ ; K:  $0,3 \pm 0,05$ ;  $n=5$ /grupa/płeć; **Ryc. 13 A**). Natomiast w przypadku poziomu transkryptu dla *Gpr54* oraz *Sirt1* u samic w wątrobie nie wykazano istotnych statystycznie różnic w tych parametrach pomiędzy grupami KAF i K ( $p=0,67$  oraz  $p=0,16$ , odpowiednio; **Ryc. 13 C i E**).

Analiza danych dotycząca poziomu mRNA dla *Kiss1* oraz *Gpr54* w wątrobie u samców nie wykazała różnic w tych parametrach pomiędzy grupami KAF i K ( $p=0,53$  oraz  $p=0,70$ , odpowiednio; **Ryc. 13 B i D**). Natomiast, zaobserwowano wyższy poziom transkryptu dla *Sirt1* w wątrobie u samców z grupy KAF w porównaniu z grupą K ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 13 F**). Poziom mRNA dla *Sirt1* u samców z grupy KAF był o ponad 1 raz wyższy w porównaniu z grupą K (KAF:  $0,14 \pm 0,007$ ; K:  $0,11 \pm 0,007$ ;  $n=5$ /grupa/płeć; **Ryc. 13 F**).



**Rycina 13.** Poziom mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* w wątrobie potomstwa w PND 25

Poziom mRNA dla *Kiss1* u samic (A) i samców (B); Poziom mRNA dla *Gpr54* u samic (C) i samców (D); Poziom mRNA dla *Sirt1* u samic (E) i samców (F); K - grupa

kontrolna, KAF - grupa kafeteryjna; PND 25 – 25 dzień po urodzeniu n= 9-13 dla samic;  
n= 7-10 dla samców; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

## 4.2. Eksperyment 2

### 4.2.1. Matki

U matek utrzymywanych na KAF nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w masie ciała w trakcie trwania eksperymentu w porównaniu z grupą K ( $p > 0,12$ ; **Tabela 3**). Natomiast samice z grupy KAF charakteryzowały się wyższą procentową zawartością tkanki tłuszczowej w trzecim, ósmym oraz dziewiątym tygodniu podawania diety w porównaniu z grupą K ( $p < 0,03$ ; **Tabela 3**).

Czas trwania ciąży był podobny w obu grupach i wynosił średnio: dla grupy KAF 23 dni, dla grupy K 24 dni (**Tabela 3**).

Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie różnic w stężeniu glukozy we krwi pomiędzy matkami z grup KAF i K ( $p > 0,15$ ; **Tabela 3**).

Parametr	Kontrola (K)	Dieta kafeteryjna (KAF)	Wartość p
Masa ciała tydz. 0	196,4 ± 10,5	199 ± 9,5	0,86
Masa ciała tydz. 1	229,1 ± 11,3	243,2 ± 12,2	0,42
Masa ciała tydz. 2	250,2 ± 11,3	260,8 ± 9,1	0,49
Masa ciała tydz. 3	271,6 ± 11,5	288 ± 11,7	0,35
Masa ciała tydz. 4	287 ± 9,8	317 ± 14	0,12
Masa ciała tydz. 5	300,2 ± 10,8	335 ± 17,8	0,13
Masa ciała tydz. 6	317,2 ± 10,4	348,8 ± 20,6	0,21
Masa ciała tydz. 7	325,2 ± 9,8	367,4 ± 21,9	0,12
Masa ciała tydz. 8	339,2 ± 8,7	379,2 ± 25,3	0,17
Masa ciała tydz. 9	344,2 ± 10,7	390,4 ± 24,8	0,13
Masa ciała tydz. 10	355,4 ± 13,8	408,8 ± 28,1	0,13
Masa ciała tydz. 11	371,2 ± 12,9	406,6 ± 25,8	0,25
Masa ciała tydz. 12	391,6 ± 10,4	431,8 ± 27,5	0,21
Masa ciała tydz. 13	436,6 ± 10,6	477,6 ± 28,9	0,22
Masa ciała tydz. 14	430,2 ± 32,8	489,2 ± 32,9	0,24
Masa ciała tydz. 15	377,6 ± 22,3	409,4 ± 13,6	0,26
Masa ciała tydz. 16	363,6 ± 25,2	387,2 ± 12,2	0,42
Masa ciała tydz. 17	357,4 ± 21,3	373,4 ± 10,8	0,52
% zawartość tkanki tłuszczowej tydz. 3	16,3 ± 1,0	26,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	<0,0001
% zawartość tkanki tłuszczowej tydz. 8	30,9 ± 2,0	43,3 ± 2,5 <sup>b</sup>	0,003
% zawartość tkanki tłuszczowej tydz. 9	32,7 ± 2,0	44,9 ± 2,5 <sup>c</sup>	0,003
Poziom glukozy we krwi (mg/dl)	91,8 ± 15,5	116,8 ± 15,5	0,15
Długość ciąży (dni)	24	23	---

**Tabela 3.** Dane dotyczące parametrów badanych u matek

W tabeli przedstawiono średnie masy ciała matek w tygodniowych punktach czasowych przed ciążą, w czasie ciąży i laktacji, procentową zawartość tkanki tłuszczowej w trzech punktach czasowych (3, 8 i 9 tygodniu ciąży), poziom glukozy we krwi oraz długość ciąży w obu grupach; n=5 matek/grupa; K - grupa kontrolna, KAF - grupa kafeteryjna.

<sup>a</sup> Dla % zawartości tkanki tłuszczowej tydzień 3: KAF > K

<sup>b, c</sup> Dla % zawartości tkanki tłuszczowej odpowiednio w 8 i 9 tygodniu: KAF > K

#### 4.2.2. Dane rozwojowe - potomstwo

Potomstwo z grupy KAF miało niższą masę ciała w 4 dniu po urodzeniu w porównaniu do K ( $p < 0,005$ ). Dodatkowo, zarówno samice, jak i samce z grupy KAF miały niższą masę ciała w badanych punktach czasowych w okresie od 21 do 60 dnia po urodzeniu w porównaniu z grupą K ( $p < 0,05$ ; **Tabela 4**). Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej u samic KAF tylko w 35 dniu po urodzeniu była niższa w porównaniu z grupą K ( $p < 0,05$ ; **Tabela 4**). W pozostałych punktach czasowych u samic (PND 30 i 60) i samców (PND 40, 45 i 60) nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w procentowej zawartości tkanki tłuszczowej.

		Kontrola (K)				Dieta kafeteryjna (KAF)			
Samice	Dzień po urodzeniu (PND)	21	30	35	60	21	30	35	60
	n	24	8	8	8	16	5	5	6
	Masa ciała	59,4 ± 1,3	105,1 ± 2,1	145,5 ± 3,3	260,4 ± 1,7	38,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	75,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	112,2 ± 2,3 <sup>c</sup>	239 ± 7,8 <sup>d</sup>
	% zawartość tkanki tłuszczowej	---	16,6 ± 0,7	15,2 ± 0,6	27,1 ± 1,5	---	15,5 ± 1,0	12,5 ± 1,0 <sup>e</sup>	24,8 ± 1,5
Samce	Dzień po urodzeniu (PND)	21	40	45	60	21	40	45	60
	n	25	8	8	9	28	8	10	10
	Masa ciała	60,7 ± 1,2	199,8 ± 4	253,7 ± 4,1	391,8 ± 7,9	40,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	166,4 ± 3,5 <sup>b</sup>	206,8 ± 4 <sup>c</sup>	338,7 ± 7,2 <sup>d</sup>
	% zawartość tkanki tłuszczowej	---	14,6 ± 1	16,8 ± 1,4	22,8 ± 1,1	---	12,7 ± 1	15,1 ± 1,2	20,4 ± 1,1

**Tabela 4.** Średnia wartość masy ciała oraz procentowa zawartość tkanki tłuszczowej potomstwa w trakcie trwania eksperymentu

W tabeli przedstawiono średnie masy ciała samic i samców potomstwa w czterech punktach czasowych; masę ciała potomstwa porównywano w odpowiednich punktach czasowych z grupą K; procentową zawartość tkanki tłuszczowej mierzono w trzech punktach czasowych; --- pomiarów nie wykonywano; K - grupa kontrolna, KAF – grupa kafeteryjna.

<sup>a, b, c</sup> masy ciała potomstwa - samice: KAF 21<K 21, KAF 30<K 30 i KAF 35<K 35 ( $p's < 0,001$ ); <sup>d</sup> KAF 60<K 60 ( $p < 0,05$ )

<sup>e</sup> dla % zawartości tkanki tłuszczowej w potomstwie samic: KAF 35<K 35 ( $p < 0,05$ )

<sup>a, b, c, d</sup> masy ciała potomstwa – samce: KAF 21<K 21, KAF 40<K 40, KAF 45<K 45 i KAF 60<K 60 ( $p's < 0,001$ )

#### 4.2.3. Długotrwała ekspozycja na KAF matek powoduje płciowo-zależne zmiany składu ciała potomstwa

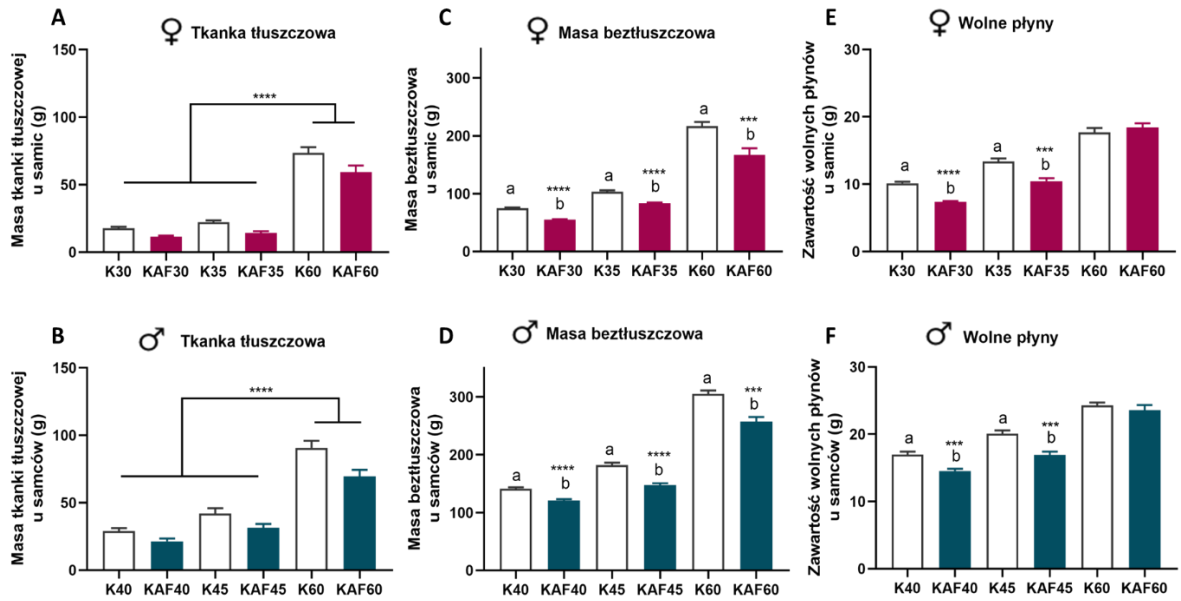
Analiza danych z pomiarów składu ciała potomstwa wykazała efekt główny wieku ( $p < 0,0001$ ) na masę tkanki tłuszczowej potomstwa płci żeńskiej. Samice z grupy KAF miały niższą masę tkanki tłuszczowej w PNDs 30 i 35 w porównaniu z PND 60 ( $p < 0,0001$ ; **Ryc. 14 A**).

Stwierdzono również efekt główny wieku ( $p < 0,0001$ ) i grupowy ( $p < 0,001$ ) w przypadku masy beztłuszczowej dla samic. Samice w PND 30 miały niższą masę beztłuszczową w porównaniu z PND 35 ( $p < 0,0001$ ). Ponadto beztłuszczowa masa samic w PNDs 30 i 35 była niższa w porównaniu z PND 60 ( $p < 0,0001$ ). Efekty grupowe ujawniono w PNDs 30 i 60, gdzie samice z grupy KAF miały niższą masę beztłuszczową w porównaniu z samicami z grupy K w tym samym wieku ( $p < 0,0001$ ; **Ryc. 14 C**).

Wykazano również efekt grupy, efekt wieku i interakcji grupa x wiek w przypadku wolnych płynów ustrojowych u samic. Samice w PNDs 30 i 35 miały mniej wolnych płynów w organizmie w porównaniu z PND 60 ( $p < 0,0001$ ). Dodatkowo, w PND 30 samice z grupy KAF miały mniejszą ilość wolnych płynów w porównaniu z grupą K ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 14 E**).

W przypadku samców wykazano główny efekt wieku dla: masy tkanki tłuszczowej, masy beztłuszczowej i wolnych płynów ustrojowych ( $p < 0,001$ ; **Ryc. 14 B, 14 D, 14 F**). Samce w PNDs 40 i 45 miały niższą masę tkanki tłuszczowej w porównaniu z PND 60 ( $p < 0,0001$ ; **Ryc. 14 B**). W przypadku masy beztłuszczowej i wolnych płynów ustrojowych samce w PND 40 osiągnęły niższe wartości w porównaniu z PND 45 ( $p < 0,0001$ ). Co więcej, wartości te były niższe w PND 45 w porównaniu z PND 60 ( $p < 0,0001$ ; **Ryc. 14 D, 14 F**).





**Rycina 14.** Badanie składu ciała potomstwa

Średnie wartości: tkanki tłuszczowej (g) u samic (A) i samców (B) masy beztłuszczowej (g) u samic (C) i samców (D) oraz wolnych płynów (g) u samic (E) i samców (F). Wszystkie pomiary zostały wykonane w trzech punktach czasowych dla każdej płci. Gwiazdki zostały użyte do oznaczenia efektów głównych, a litery do pokazania różnic pomiędzy grupami. Różne litery a,b - oznaczają istotność; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; K - grupa kontrolna, KAF - grupa kafeterijna;  $n = 5-8$  dla samic;  $n = 8-10$  dla samców.

#### 4.2.4. Długotrwała ekspozycja na KAF matki powoduje płciowo-zależne zmiany w profilu metabolicznym potomstwa

##### **Głukoza**

U samic zaobserwowano efekt grupy ( $p < 0,05$ ) oraz interakcję pomiędzy grupą i wiekiem ( $p < 0,05$ ) w stężeniu glukozy w surowicy krwi. Analiza *post-hoc* wykazała niższe stężenie glukozy w PND 30 u samic z grupy KAF w porównaniu do PND 60 ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 15 A**). U samców nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu glukozy w surowicy krwi ( $p > 0,54$ ; **Ryc. 15 B**).

##### **Insulina**

U samic nie zaobserwowano efektu grupy, efektu wieku, a także interakcji pomiędzy wiekiem a grupą ( $p > 0,2$ ) w stężeniu insuliny w surowicy krwi (**Ryc. 15 C**). Natomiast analiza danych na wykresie potwierdzona analizą *post-hoc* wykazała, że poziom insuliny był wyższy u samic z grupy KAF w PND 60 w porównaniu do PND 35 ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 15 C**). Podobnie do samic, u samców nie zaobserwowano efektu wieku ( $p = 0,24$ ) oraz efektu grupy ( $p = 0,15$ ; **Ryc. 15 D**). Natomiast wykazano interakcję pomiędzy wiekiem, i grupą ( $p < 0,005$ ). Stężenie insuliny w surowicy krwi było wyższe u samców z grupy KAF w PND 45 w porównaniu do samców z grupy KAF w PND 40 ( $p < 0,001$ ; **Ryc. 15 D**).

##### **Cholesterol**

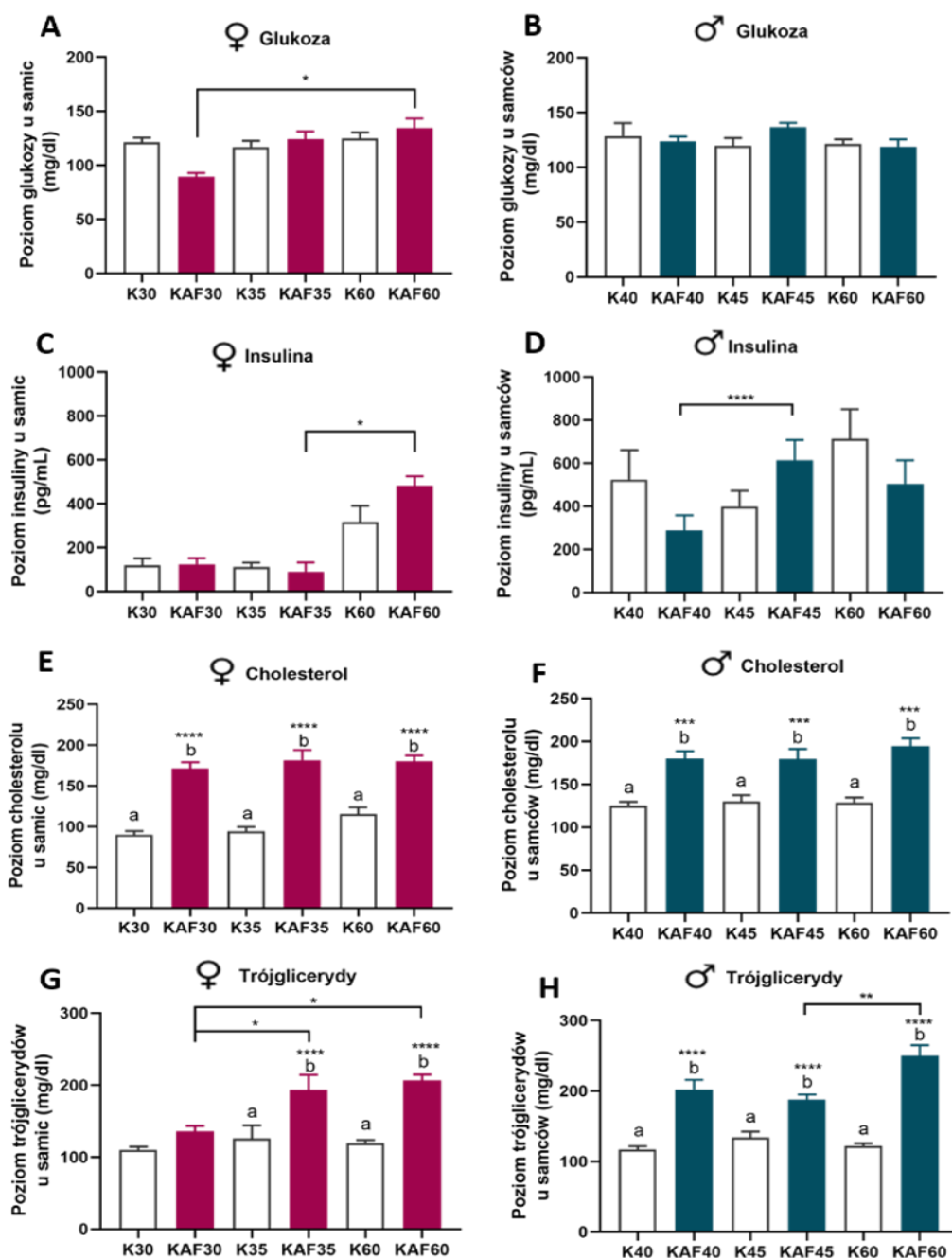
U samic wykazano efekt grupy ( $p < 0,005$ ) oraz efekt wieku ( $p < 0,05$ ) w stężeniu cholesterolu w surowicy krwi. Analiza *post-hoc* wykazała wyższe stężenie u grupy KAF w porównaniu z grupą K w każdym z badanych punktów czasowych ( $p's < 0,001$ ; **Ryc. 15 E**). Podobnie jak w przypadku samic, u samców również zaobserwowano efekt grupy ( $p < 0,001$ ) w stężeniu cholesterolu w surowicy krwi. Analiza *post-hoc* wykazała wyższe stężenie u grupy KAF w porównaniu do grupy K w każdym z badanych punktów czasowych ( $p's < 0,005$ ; **Ryc. 15 F**).

##### **Trójglicerydy**

W poziomie trójglicerydów u samic zaobserwowano efekt grupy ( $p < 0,05$ ) oraz interakcje pomiędzy grupą a wiekiem ( $p < 0,01$ ), natomiast nie zaobserwowano efektu wieku ( $p = 0,29$ ; **Ryc. 15 G**). Poziom trójglicerydów był wyższy w grupie KAF

w porównaniu do grupy K w dwóch badanych punktach czasowych (PND 35 oraz PND 60) ( $p$ 's<0,001; **Ryc. 15 G**). Dodatkowo w grupie samic z grupy KAF w PND 35 oraz PND 60 zaobserwowano wyższy poziom trójglicerydów niż u samic z grupy KAF w PND 30 ( $p$ 's<0,05; **Ryc. 15 G**).

W przypadku samców, zaobserwowano efekt grupy ( $p$ <0,001), interakcje pomiędzy grupą i wiekiem ( $p$ <0,005), natomiast nie zaobserwowano efektu wieku ( $p$ =0,24) w poziomie trójglicerydów (**Ryc. 15 H**). Poziom trójglicerydów był wyższy u samców z grupy KAF w każdym z badanych punktów czasowych w porównaniu do grup K ( $p$ 's<0,001; **Ryc. 15 H**). Dodatkowo, w grupie samców KAF w PND 60 poziom trójglicerydów był wyższy niż u samców z grupy KAF w PND 45 ( $p$ <0,01; **Ryc. 15 H**).



**Rycina 15.** Profil metaboliczny u potomstwa

Poziomy: glukozy u samic (A) i samców (B), insuliny u samic (C) i samców (D), cholesterolu u samic (E) i samców (F) oraz trójglicerydów u samic (G) i samców (H). Wszystkie pomiary zostały wykonane w trzech punktach czasowych dla każdej płci. Gwiazdki z liniami zostały użyte do oznaczenia efektów głównych, a litery do pokazania różnic pomiędzy grupami. Różne litery a,b - oznaczają istotność; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; K – grupa kontrolna, KAF – grupa kafeteryjna;  $n = 5-8$  dla samic;  $n = 8-10$  dla samców.

#### 4.2.5. Analiza wpływu długoterminowej ekspozycji na KAF matki na profil hormonalny potomstwa

##### **Estradiol (E<sub>2</sub>)**

U samic nie zaobserwowano efektu grupy, wieku oraz interakcji pomiędzy grupą a wiekiem w poziomie estradiolu ( $p > 0,7$ ; **Ryc. 16 A**).

##### **Testosteron (T)**

W przeciwieństwie do samic, u samców, zaobserwowano efekt wieku ( $p < 0,0005$ ), jednak nie stwierdzono efektu grupy ( $p = 0,25$ ) oraz interakcji pomiędzy grupą a wiekiem ( $p = 0,73$ ) w poziomie testosteronu (**Ryc. 16 B**). Poziom testosteronu był wyższy u samców z grupy KAF w PND 60 w porównaniu do grup KAF w PND 45 oraz KAF w PND 40 ( $p$ 's  $< 0,05$ ). Natomiast tylko u samców z grupy K poziom testosteronu był wyższy w PND 60 tylko w porównaniu do grupy K w PND 40 ( $p < 0,005$ ; **Ryc. 16 B**).

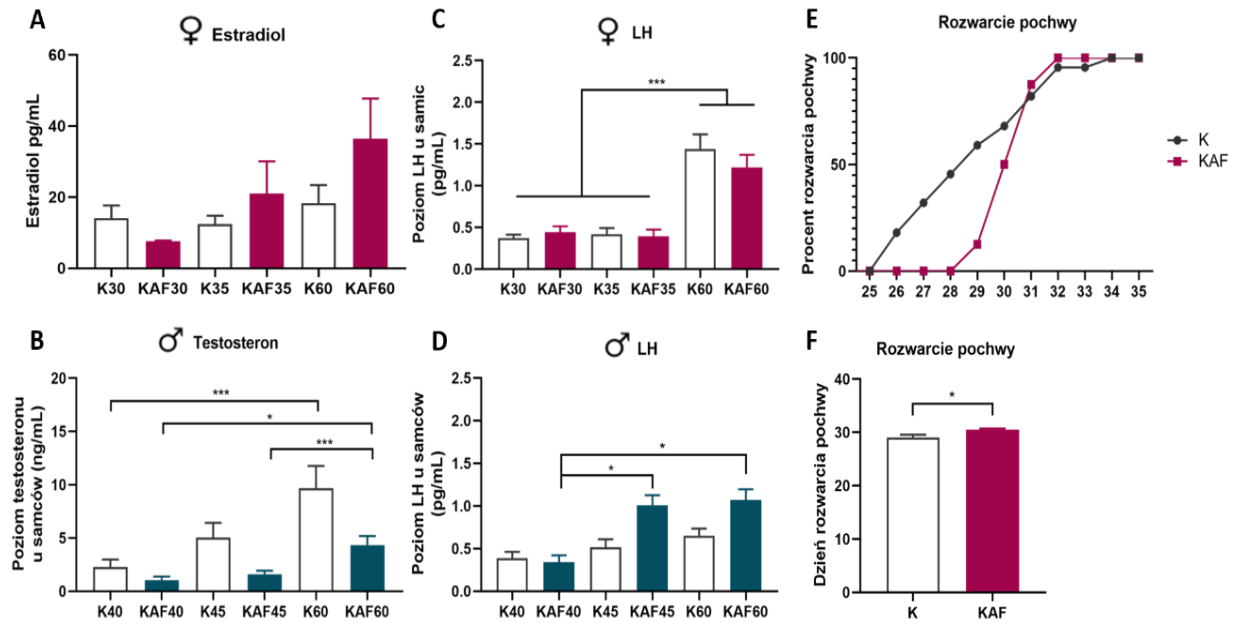
##### **Hormon luteinizujący (LH)**

U samic zaobserwowano efekt wieku ( $p < 0,005$ ) w poziomie hormonu luteinizującego. Analiza *post-hoc* wykazała, że poziom hormonu luteinizującego w PND 60 był najwyższy w porównaniu do PND 30 oraz PND 35 ( $p < 0,005$ ); **Ryc. 16 C**).

W grupie samców nie wykazano efektu grupy ( $p = 0,9$ ), efektu wieku ( $p = 0,15$ ) oraz interakcji pomiędzy grupą a wiekiem ( $p = 0,3$ ) w poziomie hormonu luteinizującego. Jednakże analiza danych na wykresie potwierdzona analizą *post-hoc* wykazała wyższy poziom hormonu luteinizującego u samców z grupy KAF w PND 45 oraz KAF w PND 60 w porównaniu do grupy KAF w PND 40 ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 16 D**).

#### 4.2.6. Długotrwała ekspozycja na KAF matki powoduje opóźnienie rozwarcia pochwy u samic

U samic z grupy KAF zaobserwowano trzydniowe opóźnienie w rozwarciu pochwy w porównaniu do samic z grupy K. U samic z grupy K rozwarcie pochwy rozpoczęło się od PND 25, natomiast u samic z grupy KAF od PND 28 ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 16 E i F**).



**Rycina 16.** Profil hormonalny potomstwa (samice i samce) oraz otwarcie pochwy u samic

Poziom estradiolu u samic (A); Poziom testosteronu u samców (B); Poziom LH u samic (C) i samców (D); Hormony mierzono w trzech punktach czasowych dla każdej płci; Liczba samic z rozwarciem pochwy (w %) (E) i dzień rozwarcia pochwy u samic (F); K – grupa kontrolna, KAF – grupa kafeteryjna;  $n = 5-8$  dla samic;  $n = 8-10$  dla samców. Gwiazdki zostały użyte do oznaczenia efektów głównych. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

#### 4.2.7. Długoterminowa ekspozycja na KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* oraz stosunku *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu potomstwa

U samic nie wykazano efektu grupy, wieku oraz interakcji pomiędzy grupą i wiekiem w poziomach transkryptu dla *Kiss1* w podwzgórzu ( $p > 0,6$ ; **Ryc. 17 A**).

W przeciwieństwie do samic, u samców zaobserwowano efekt wieku ( $p < 0,005$ ) w poziomie mRNA dla *Kiss1* w podwzgórzu. Efekt wieku podyktowany był grupą K (**Ryc. 17 B**). Poziom transkryptu dla *Kiss1* był wyższy dla K w PND 40 oraz K w PND 45 w porównaniu do K w PND 60 ( $p$ 's  $< 0,05$ ; **Ryc. 17 B**).

Analiza danych dotycząca poziomu mRNA dla *Gpr54* w podwzgórzu u samic wykazała efekt wieku ( $p < 0,0001$ ; **Ryc. 17 C**). W analizie *post-hoc* zaobserwowano niższy poziom transkryptu w PND 60 w porównaniu do PND 35 oraz PND 30 ( $p < 0,01$ ; **Ryc. 17 C**). Jednakże, u samic nie zaobserwowano efektu grupy ( $p = 0,1$ ) oraz interakcji pomiędzy grupą i wiekiem ( $p = 0,7$ ).

W grupie samców zaobserwowano efekt wieku ( $p < 0,0001$ ) oraz interakcję pomiędzy grupą i wiekiem ( $p < 0,0001$ ) w poziomie mRNA dla *Gpr54* w podwzgórzu (**Ryc. 17 D**). Analiza *post-hoc* wykazała, że w grupie KAF, ale nie w grupie K, poziom transkryptu dla *Gpr54* w PND 45 był niższy niż w PND 40 ( $p < 0,001$ ). Co więcej, samce z grupy KAF w PND 45 wykazywały niższy poziom transkryptu dla *Gpr54* w porównaniu z grupą K w PND 45 (a vs. b;  $p < 0,001$ ; **Ryc. 17 D**). Dodatkowo, u samców z grup KAF oraz K zaobserwowano niższy poziom mRNA dla *Gpr54* w PND 60 w porównaniu z PND 45 ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 17 D**).

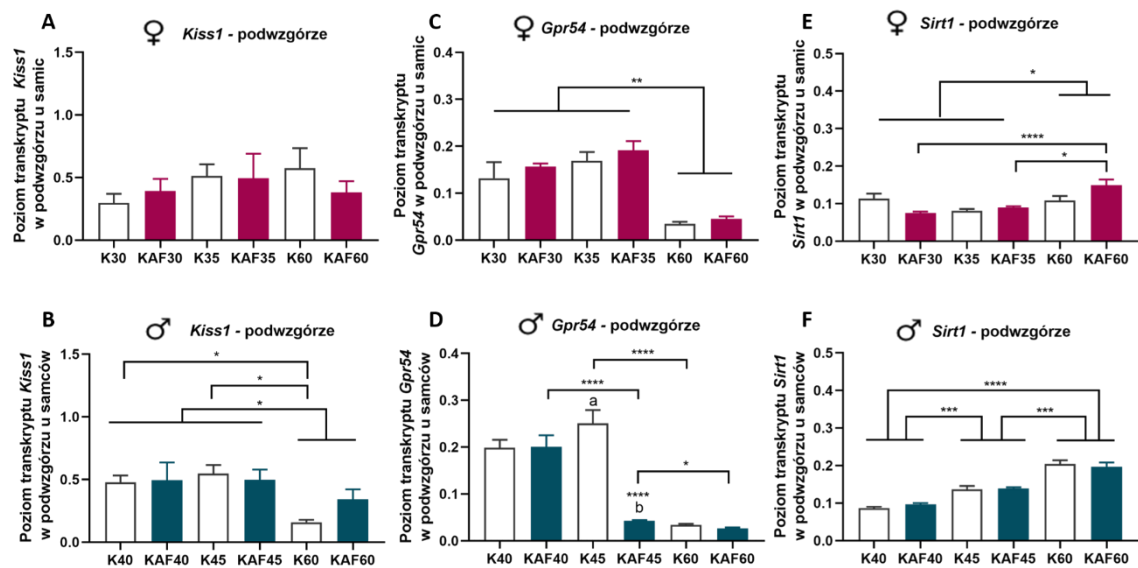
Wykazano efekt grupy ( $p < 0,05$ ), efekt wieku ( $p < 0,05$ ) oraz interakcje pomiędzy grupą i wiekiem ( $p < 0,005$ ) w poziomie mRNA dla *Sirt1* u samic. Poziom transkryptu dla *Sirt1* był wyższy w PND 60 w porównaniu do PND 30 oraz PND 35 ( $p < 0,05$ ; **Ryc. 17 E**). Efekt wieku podyktowany był grupą KAF. Tylko u samic z grupy KAF poziom transkryptu dla *Sirt1* był wyższy w PND 60 w porównaniu do PND 30 oraz PND 35 ( $p$ 's  $< 0,05$ ; **Ryc. 17 E**). W grupie K nie zaobserwowano takich różnic ( $p > 0,2$ ).

Analizowano również stosunek mRNA dla *Sirt1/Kiss1* w badanych punktach czasowych. W PND 30 stosunek ten wynosił 0,2 u samic z grupy KAF i 0,4 u samic z grupy K. Natomiast w PND 35 u samic stosunek ten był taki sam w grupach KAF i K

(dla KAF i K: 0,2). Jednakże, stosunek *Sirt1/Kiss1* mRNA w dniu PND 60 u samic był przeciwny do tego z PND 30 w grupie KAF i K (dla KAF: 0,4; dla K: 0,2).

U samców również zaobserwowano efekt wieku ( $p < 0,0001$ ) z rosnącym poziomem mRNA dla *Sirt1* wraz z wiekiem (Ryc. 17 F). Poziom transkryptu dla *Sirt1* był najwyższy w PND 60, natomiast najniższy w PND 40. Co więcej, zaobserwowano wzrost poziomu mRNA dla *Sirt1* w PND 45 w porównaniu do PND 40 ( $p < 0,005$ ; Ryc. 17 F). U samców nie zaobserwowano efektu grupy ( $p = 0,06$ ) oraz interakcji pomiędzy grupą a wiekiem ( $p = 0,07$ ).

Podobnie jak w przypadku samic, sprawdzony został stosunek transkryptów *Sirt1/Kiss1*. W przypadku samców w PND 40 i PND 45 stosunek dla *Sirt1/Kiss1* mRNA był taki sam w grupach KAF i K (PND 40: dla KAF 0,2; dla K 0,2; PND 45: dla KAF 0,3; dla K 0,3). Natomiast w PND 60 wskaźnik ten był niższy u potomstwa samców z grupy KAF niż w grupie K (dla KAF: 0,6; dla K: 1,3).



**Rycina 17.** Poziom mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* potomstwa w podwzgórze

Poziom mRNA dla *Kiss1* u samic (A) i samców (B); Poziom mRNA dla *Gpr54* u samic (C) i samców (D); Poziom mRNA dla *Sirt1* u samic (E) i samców (F). Wszystkie pomiary zostały wykonane w trzech punktach czasowych dla każdej płci. Gwiazdki z liniami zostały użyte do oznaczenia efektów głównych, a litery do pokazania różnic pomiędzy grupami. Różne litery a,b - oznaczają istotność statystyczną; K – grupa kontrolna, KAF – grupa kafeteryjna; n= 5-8 dla samic; n= 8-10 dla samców. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

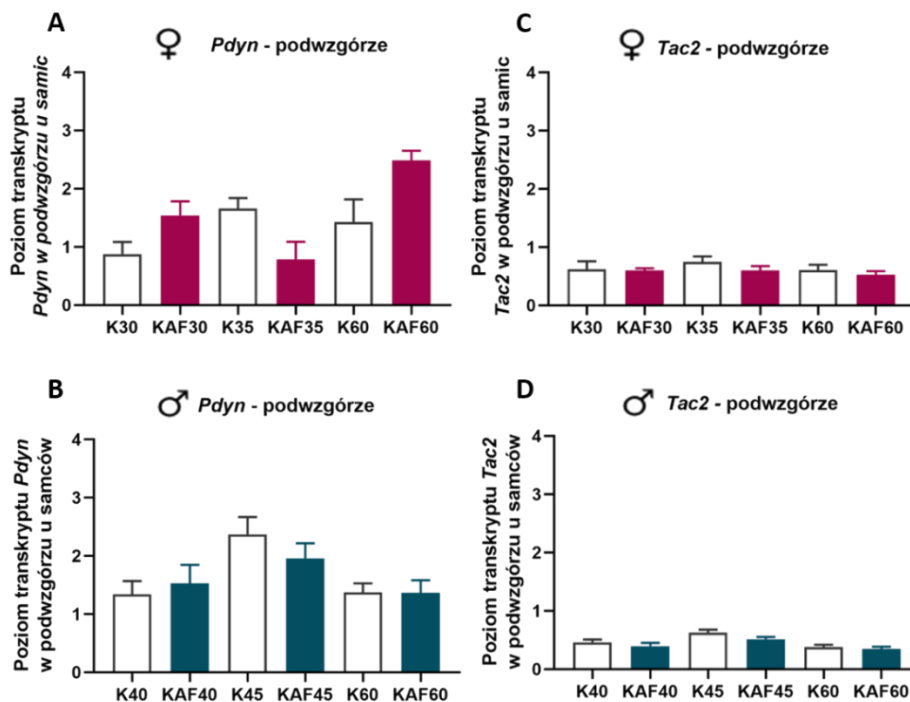


#### 4.2.8. Długoterminowa ekspozycja na KAF matki nie wpływa na poziom mRNA dla *Pdyn* oraz *Tac2* w podwzgórzu samic i samców

U samic nie wykazano efektu grupy ( $p=0,2$ ), efektu wieku ( $p=0,7$ ) oraz interakcji pomiędzy grupą i wiekiem ( $p=0,1$ ) w poziomie mRNA dla *Pdyn* w podwzgórzu (Ryc. 18 A).

U samców również nie zaobserwowano efektu wieku, efektu grupy oraz interakcji pomiędzy grupą i wiekiem dla poziomu transkryptu dla *Pdyn* w podwzgórzu ( $p>0,7$ ; Ryc. 18 B).

Podobnie jak w przypadku *Pdyn*, u samic nie wykazano efektu grupy, efektu wieku oraz nie stwierdzono interakcji pomiędzy grupą i wiekiem w poziomie mRNA dla *Tac2* ( $p>0,6$ ; Ryc. 18 C). U samców, tak jak w przypadku *Pdyn*, nie zaobserwowano efektu wieku, efektu grupy oraz interakcji pomiędzy grupą i wiekiem w poziomie mRNA dla *Tac2* w podwzgórzu ( $p>0,06$ ; Ryc. 18 D).



**Rycina 18.** Poziom mRNA dla *Pdyn* oraz *Tac2* potomstwa w podwzgórzu

Poziom mRNA dla *Pdyn* u samic (A) i samców (B); Poziom mRNA dla *Tac2* u samic (C) i samców (D). Wszystkie pomiary wykonano w trzech punktach czasowych dla każdej płci; K – grupa kontrolna, KAF – grupa kafeteryjna;  $n= 5-8$  dla samic;  $n= 8-10$  dla samców.

#### **4.2.9. Długoterminowa ekspozycja na KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* w wątrobie samic i samców. Zmiany te są bardziej widoczne u samców.**

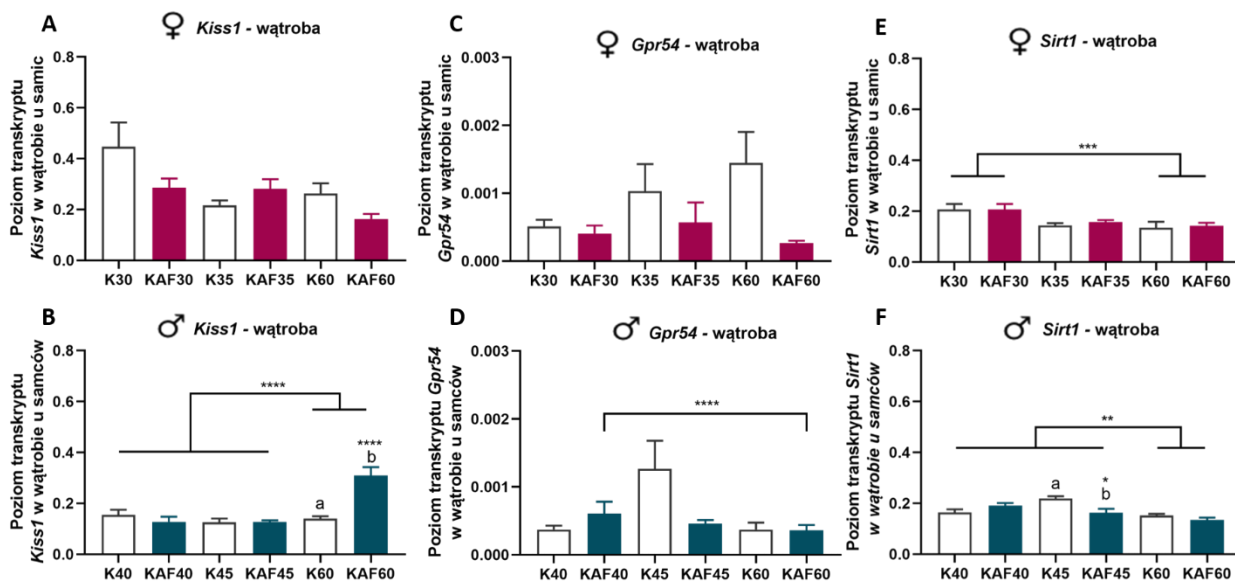
U samic nie zaobserwowano efektu grupy ( $p=0,3$ ) oraz interakcji pomiędzy grupą i wiekiem ( $p=0,2$ ) w poziomie mRNA dla *Kiss1* w wątrobie. W grupie samic zaobserwowano natomiast efekt wieku ( $p<0,05$ ) w poziomie transkrypty dla *Kiss1* w wątrobie (**Ryc. 19 A**). Jednakże, analiza *post-hoc* wykazała, że efekt wieku ujawnił się tylko pomiędzy samicami z grupy K w PND 30 a samicami z grupy KAF PND 60. Różnica ta nie jest istotna dla badań niniejszej rozprawy, dlatego nie została uwzględniona na rycinie.

W grupie samców wykazano interakcje pomiędzy grupą i wiekiem ( $p<0,001$ ) w poziomie mRNA dla *Kiss1* w wątrobie (**Ryc. 19 B**). U samców z grupy KAF w PND 60 poziom transkrypty dla *Kiss1* był wyższy w porównaniu z grupą K w PND 60 (a vs. b;  $p<0,001$ ). Dodatkowo, poziom mRNA dla *Kiss1* w grupie KAF w PND 60 był wyższy w porównaniu z innymi punktami czasowymi zarówno w grupie KAF jak i K ( $p<0,001$ ; **Ryc. 19 B**).

Analiza danych dotyczących poziomu transkrypty dla *Gpr54* w wątrobie nie wykazała efektu grupy, efektu wieku oraz interakcji pomiędzy grupą, a wiekiem u samic ( $p>0,2$ ; **Ryc. 19 C**). Natomiast u samców wykazano interakcję grupy i wieku ( $p<0,001$ ) w poziomie mRNA *Gpr54* mRNA (**Ryc. 19 D**), z wyższym poziomem tego transkrypty u samców z grupy KAF w PND 40 w porównaniu do grupy KAF w PND 60.

W grupie samic zaobserwowano efekt wieku ( $p<0,05$ ) w poziomie mRNA dla *Sirt1* w wątrobie z wyższym poziomem transkrypty w PND 30 w porównaniu do PND 60 ( $p<0,05$ ; **Ryc. 19 E**).

U samców wykazano również efekt wieku ( $p<0,001$ ) oraz interakcje pomiędzy grupą i wiekiem ( $p<0,01$ ; **Ryc. 19 F**). Poziom mRNA dla *Sirt1* w wątrobie był wyższy w PND 40 oraz PND 45 w porównaniu do PND 60 ( $p<0,01$ ). Co więcej, samce z grupy KAF w PND 45 charakteryzowały się niższym poziomem mRNA dla *Sirt1* w porównaniu do grupy K w PND 45 (a vs. b;  $p<0,05$ ; **Ryc. 19 F**).



**Rycina 19.** Poziom mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* u potomstwa w wątrobie

Poziom mRNA dla *Kiss1* u samic (A) i samców (B); Poziom mRNA dla *Gpr54* u samic (C) i samców (D); Poziom mRNA dla *Sirt1* u samic (E) i samców (F). Wszystkie pomiary zostały wykonane w trzech punktach czasowych dla każdej płci. Gwiazdki z liniami zostały użyte do oznaczenia efektów głównych, a litery do pokazania różnic pomiędzy grupami. Różne litery a,b - oznaczają istotność statystyczną; K - grupa kontrolna, KAF – grupa kafeteryjna; n= 5-8 dla samic; n= 8-10 dla samców; \* p<0,05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0,005; \*\*\*\* p<0,001.

#### **4.3. Wykaz analiz przeprowadzonych samodzielnie przez Doktorantkę oraz przy współpracy z innymi naukowcami**

1. Prowadzenie eksperymentów na szczurach
2. Prowadzenie pomiarów masy i składu ciała szczurów
3. Pobieranie tkanek do dalszych analiz
4. Wykonanie testów immunoenzymatycznych ELISA z surowicy krwi dla profilu metabolicznego, immunologicznego i hormonalnego
5. Uczestniczenie w wykonywaniu analiz rt-PCR
6. Wykonanie analiz statystycznych wyników uzyskanych z eksperymentu 1
7. Uczestniczenie w badaniach z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI)

Dr Tomasz Zalewski – Uczelniane Centrum Nanobiomedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu – Przeprowadzenie badań MRI, analiza otrzymanych wyników.

Dr hab. Joanna Nowacka -Woszek – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt – Koordynacja badań rt-PCR

Dr Łukasz Dylewski – Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Katedra Zoologii – Przeprowadzenie analiz statystycznych z wyników uzyskanych w eksperymencie 2.

Zwierzęta hodowano w zwierzętarni na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki

#### **Publikacja wyników**

Wyniki eksperymentu 1 dotyczące: masy ciała matek, zawartości tkanki tłuszczowej matek, spożycia pokarmu u matek, objętości tkanki tłuszczowej między łopatkowej matek, masy ciała potomstwa, procentowej zawartości tkanki tłuszczowej potomstwa, profilu metabolicznego (glukoza i insulina) oraz immunologicznego zostały opublikowane w czasopiśmie Scientific Reports (2 letni IF – 4,996; 5 letni IF – 5,516) – artykuł został załączony do rozprawy doktorskiej.

Wyniki eksperymentu 1 dotyczące: analizy składu ciała u potomstwa, profilu metabolicznego, poziomu mRNA dla *Kiss1* i *Gpr54* w podwzgórzu, poziomu mRNA dla *Kiss1* i *Gpr54* w wątrobie nie zostały opublikowane, jednak były prezentowane na konferencji: 9th Congress of the Society for Reproductive Biology, 2-4.09.2021, *Influence of mothers' cafeteria diet on body composition, metabolic profile and transcript level of Kiss1 and Gpr54 in rats offspring*. Konferencja odbyła się zdalnie.

Wyniki uzyskane w czasie przeprowadzenia eksperymentu 2 zostały opisane i opublikowane w czasopiśmie *Biology of Reproduction* (2 letni IF – 3,6; 5 letni IF – 4,2) – artykuł został dołączony do rozprawy doktorskiej.

## V Dyskusja

### 5.1. Eksperyment 1

Wyniki eksperymentu 1 potwierdzają założoną hipotezę wpływu spożywania KAF przez samice szczura przed ciążą, w trakcie ciąży i podczas laktacji na profil metaboliczny oraz immunologiczny oraz poziom mRNA dla *Kiss1* w podwzgórzu i wątrobie oraz dla *Sirt1* w wątrobie u potomstwa w płciowo-zależny sposób. Zaobserwowano różnice w parametrach profilu metabolicznego, immunologicznego, masie i składzie ciała oraz w poziomach transkryptu dla kisspeptyny w podwzgórzu oraz poziomach transkryptu dla kisspeptyny i sirtuiny w wątrobie.

Dodatkowo w eksperymencie został zbadany wpływ KAF na organizm matki. Wykazano wzrost spożycia pokarmu przez matki z grupy KAF w drugim i trzecim tygodniu podawania diety oraz w drugim tygodniu ciąży w porównaniu do grupy K. Wyniki te pokrywają się z badaniami przeprowadzonymi przez Sanchez-Blanco i wsp., w których samice utrzymywane przez 22 dni przed ciążą oraz w trakcie ciąży na KAF wykazywały zwiększone spożycie pokarmu w porównaniu do grupy K (93). Pomimo wyższego spożycia pokarmu przez matki z grupy KAF nie zaobserwowano różnic w masie ciała w odniesieniu do grupy K. Tylko w szóstym tygodniu podawania KAF samice z tej grupy miały istotnie wyższą masę ciała w porównaniu z grupą K. Z drugiej strony, w badaniu przeprowadzonym przez na większej liczbie szczurzyk (n=16/grupa) zaobserwowano, że podawanie KAF od 6 do 13 tygodnia wpływa na zwiększoną masę ciała u tych zwierząt (36). Wykazano, że samice utrzymywane na KAF miały o 22 % większą masę ciała w okresie przed ciążą oraz w trakcie ciąży. Dodatkowo, samice z grupy KAF pozostawały cięższe do połowy czasu trwania laktacji w porównaniu do grupy K (36).

#### **5.1.1. KAF matki ma wpływ na płciowo-zależne obniżenie masy ciała i procentowy wzrost zawartości tkanki tłuszczowej potomstwa.**

W badaniach założono, że dieta KAF matki będzie wpływać w sposób specyficzny płciowo na masę i skład ciała. Na początku przeprowadzonych pomiarów w 3 dniu po urodzeniu (PND 3) nie zaobserwowano różnic w masie ciała pomiędzy potomstwem z grupy KAF, a potomstwem z grupy K. Natomiast różnice te zostały ujawnione w PND

25, wykazując, że zarówno samce jak i samice po matkach KAF miały niższą masę ciała niż potomstwo grupy K.

W przeprowadzonym badaniu oprócz pomiarów masy ciała wykorzystano również MRI oraz NMR, które pozwoliły oszacować skład ciała oraz określić objętość tkanki tłuszczowej. Wykorzystanie tych technik pokazało przydatność ich zastosowania w badaniach nad wpływem działania KAF w celu monitorowania rozwoju otyłości. Wykazano bowiem, że potomstwo z grupy KAF pomimo mniejszej masy ciała w porównaniu do grupy K miało większą zawartość procentową tkanki tłuszczowej w PND 25. Potwierdziło to dokonaną przez Pomar i wsp. obserwację „oszczędnego” fenotypu (ang. *thin-outside-fat-inside phenotype*) (37). Ponadto zaobserwowano większe skutki diety na badane parametry w przypadku samic. Różnice w procentowej zawartości tkanki tłuszczowej wyraźniejsze były u żeńskiego potomstwa samic z grupy KAF.

Badania przeprowadzone przez Cardenas-Perez i wsp. wykazały, że potomstwo samic utrzymywanych przez 9 tygodni na KAF (okres przed ciążą, w trakcie ciąży oraz laktacji) miało mniejszą masę ciała w porównaniu z potomstwem z grupy K (94). Co więcej, potomstwo, które po odstawieniu od matki KAF dalej było utrzymywane na tej diecie miało obniżoną masę ciała aż do 7 tygodnia życia w odniesieniu do grupy K (94). Eksperyment grupy Sanchez-Blanco również wykazał, że podawanie samicom KAF przez 22 dni przed ciążą oraz w trakcie ciąży prowadzi u potomstwa do obniżonej masy urodzeniowej w porównaniu z potomstwem z grupy K (93). Ponownie, potomstwo samic z grupy KAF utrzymywane podczas laktacji na tej samej diecie charakteryzowało się mniejszą masą ciała do PND 21 w porównaniu do potomstwa K (93). Podobne doświadczenie przeprowadzone przez Bayol i wsp. wykazało, że podawanie KAF samicom w trakcie ciąży i laktacji nie wpływa na obniżenie masy ciała urodzeniowej potomstwa oraz w momencie odstawienia od matek (95).

Płciowo-specyficzne różnice w masie ciała zaobserwowano także w badaniach z zastosowaniem prenatalnej i wczesno postnatalnej ekspozycji na HFD+KAF (96). Męskie potomstwo, ale nie żeńskie, po matkach HFD+KAF charakteryzowało się obniżoną masą ciała w PND 1. Jednakże, w PND 19 zarówno męskie jak i żeńskie potomstwo matek HFD+KAF cechowało się podwyższoną masą ciała w porównaniu do potomstwa grupy K (96).

Powyższe wyniki badań wskazują, że prenatalna ekspozycja na KAF skutkuje obniżoną masą ciała u potomstwa po odstawieniu potomstwa od matki. Obniżona masa ciała może być skutkiem zmniejszonej ilości przyjmowanego białka w trakcie spożywania KAF (97, 98).

Wiele badań, włączając także te będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdziło, że ekspozycja matki na KAF (przed ciążą i/lub w trakcie ciąży i/lub laktacji) prowadzi do nadmiernej akumulacji tkanki tłuszczowej u potomstwa (37, 38, 95, 99). Wyniki eksperymentów prezentowane w doktoracie potwierdziły, że w PND 25 zarówno u męskiego, jak i żeńskiego potomstwa samic z grupy KAF zaobserwowano wyższą procentową zawartość tkanki tłuszczowej w porównaniu do potomstwa z grupy K. Co więcej, analiza danych z NMR dotycząca ilości tkanki tłuszczowej (g) wykazała, że prenatalna ekspozycja na KAF miała większe efekty na ten parametr u samic niż na samców.

#### **5.1.2. KAF matki zmienia w zależny od płci sposób profil metaboliczny potomstwa.**

Prenatalna i/lub wczesno postnatalna ekspozycja na KAF wpływa również na profil metaboliczny u potomstwa. W niniejszych badaniach zaobserwowano płciowo-specyficzny wpływ KAF na poziom glukozy we krwi u potomstwa w PND 25. Samice z grupy KAF miały wyższy poziom glukozy we krwi w porównaniu do potomstwa z grupy K. Natomiast, w przypadku męskiego potomstwa samic z grupy KAF zaobserwowano jedynie trend we wzroście poziomu glukozy we krwi.

Zmiany w profilu metabolicznym dotyczyły także poziomu insuliny w surowicy krwi. Zarówno męskie, jak i żeńskie potomstwo po matkach KAF cechowało się podwyższonym poziomem insuliny w surowicy krwi w PND 25 w porównaniu do potomstwa z grupy K. Jednakże, znowu, różnice te wyższe były w przypadku samic. Badania przeprowadzone przez George i wsp. wykazały, że potomstwo szczurów Wistar samic utrzymywanych na KAF w trakcie ciąży nie miało podwyższonego poziomu glukozy w surowicy krwi w wieku 12 tygodni (36). Jednak, przyjmowanie KAF przez matkę w trakcie ciąży i laktacji prowadziło do podwyższenia poziomu glukozy w surowicy krwi potomstwa w porównaniu z grupą K (36). Inne badania wskazują, że podawanie KAF samicom w trakcie laktacji wpływa na zaburzoną odpowiedź w teście tolerancji glukozy u potomstwa w 3 i 6 tygodniu życia (37). Stąd też wpływ diety matki w okresie laktacji na poziom glukozy potomstwa wydaje się być znaczący.



W odróżnieniu od wyników z niniejszej rozprawy, badania Pomar i wsp. nie wykazały różnic w poziomie insuliny w surowicy krwi u potomstwa z grupy KAF w porównaniu do potomstwa z grupy K (37). Jednak w przytoczonych wyżej badaniach George i wsp. w teście tolerancji insuliny zaobserwowano wyższy poziom tego hormonu w surowicy krwi po 2 godzinach od podania insuliny u samców z grupy KAF w porównaniu z samicami z grupy KAF. Autorzy tego badania podejrzewają większą podatność samców na insulinooporność w odpowiedzi na matczyną KAF (36).

Bayol i wsp. wykazał, że ekspozycja zarówno w trakcie ciąży i laktacji, jak i późniejsze podawanie KAF wpływa na wystąpienie płciowo-specyficznych zmian w poziomach glukozy i insuliny u potomstwa (35). Żeńskie potomstwo samic z grupy KAF charakteryzowało się wyższym poziomem glukozy w wieku 10 tygodni w porównaniu do samic z grupy K. Z drugiej strony Bayol i wsp. zaobserwował wyższy poziom insuliny w surowicy krwi u męskiego potomstwa samic z grupy KAF w porównaniu do grupy K. Natomiast, nie było różnicy w poziomie insuliny pomiędzy samicami z grupy KAF i samicami z grupy K w wieku 10 tygodni (35). Badania przeprowadzone przed Bayol i wsp. wykazały, że prenatalna i wczesno postnatalna ekspozycja na KAF ma większy wpływ na zaburzenia profilu metabolicznego oraz zawartość tkanki tłuszczowej u dorosłego potomstwa, niż KAF podawana potomstwu tylko po odstawieniu od matki (35).

Poza wpływem na poziom glukozy i insuliny, matczyzna KAF prowadzi także do zmian w poziomie cholesterolu i trójglicerydów w surowicy krwi u potomstwa. Zarówno u żeńskiego, jak i męskiego potomstwa samic z grupy KAF stwierdzono podwyższony o ok. 1,6 razy u samic i 1,5 u samców poziom cholesterolu w surowicy krwi w porównaniu do potomstwa z grupy K w PND 25. Co więcej, podobną zależność wykazano w poziomie trójglicerydów u potomstwa samic z grupy KAF. Samice i samce KAF charakteryzowały się większym o 1,6 razy poziomem trójglicerydów w porównaniu do potomstwa z grupy K.

### **5.1.3. KAF matki wywołuje stan zapalny u potomstwa, zmieniając profil immunologiczny, a samice są bardziej wrażliwe na te zmiany.**

Wyniki przeprowadzonego eksperymentu wskazują również na płciowo-specyficzny wpływ KAF na parametry związane z profilem immunologicznym, potwierdzając występowanie stanu zapalnego. Zaobserwowany wzrost poziomu interleukiny 6 (IL-6)

oraz czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) żeńskiego potomstwa samic z grupy KAF w porównaniu do grupy K. Jednakże, u potomstwa męskiego nie było istotnej statystycznie różnicy w tych parametrach. Z drugiej strony badany poziom interleukiny 10 (IL-10) był podwyższony zarówno u żeńskiego, jak i męskiego potomstwa samic z grupy KAF w porównaniu do grupy K. U samic wzrost IL-10 był jednak wyraźniej zaznaczony niż u samców. Wyniki te są nowatorskie w odniesieniu do efektów działania KAF w okresie prenatalnym i wczesnorozwojowym. Dotychczas wykazano bowiem jedynie podobne zależności u dorosłych osobników utrzymywanych na diecie KAF. Samce z grupy KAF charakteryzowały się nadekspresją TNF- $\alpha$  w jelicie (100) oraz surowicy krwi (101). Co więcej, u dorosłych osobników poddanych działaniu KAF utrzymywał się stan zapalny w żółtej tkance tłuszczowej, brunatnej tkance tłuszczowej oraz w wątrobie (101).

Zarówno w badaniach klinicznych prowadzonych z udziałem ludzi, jak i tych przeprowadzanych na zwierzętach zostało dobrze udokumentowane występowanie chronicznego stanu zapalnego oraz obecność makrofagów w adipocytach w otyłości (102-104). Zmiany związane ze stanem zapalnym, wzrost poziomu interleukiny 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), wywołane spożywaniem KAF obserwowane były nie tylko obwodowo, lecz także centralnie (43). KAF podawana przez 16 tygodni dorosłym szczurom Wistar przyczyniła się do podwyższenia poziom TNF- $\alpha$  oraz spadku poziomu IL-10 oraz IL-6 w surowicy krwi w porównaniu do grupy K (43). KAF podawana przez 15 tygodni dorosłym myszom, skutkowała również podwyższeniem poziom IL-6 (24). Z drugiej strony, badania przeprowadzone przez Navarro i wsp. na dorosłych szczurach nie wykazały wpływu KAF podawanej przez 6 tygodni na parametry immunologiczne (TNF- $\alpha$  oraz IL-6) w odniesieniu do grupy K (44). Wydaje się, że kluczowym elementem wpływającym na rozwój stanu zapalnego wywołanego KAF jest czas podawania diety. KAF podawana matkom przez 8 tygodni przed ciążą oraz w trakcie ciąży nie wpłynęła na status immunologiczny matek, w łożysku oraz u płodów w 21 dniu ciąży (50).

#### **5.1.4. KAF matki prowadzi do obniżenia poziomu transkryptu dla *Kiss1* tylko u samców, ale nie ma wpływu na poziom *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* oraz *Tac2* mRNA w podwzgórzu potomstwa**

W badaniach prowadzonych w ramach eksperymentu 1 nie zaobserwowano różnic w poziomie transkryptu dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* oraz *Tac2* w podwzgórzu u żeńskiego potomstwa w PND 25. Z drugiej strony, u samców w PND 25 wykazano

wpływ KAF matki na obniżenie poziomu mRNA dla *Kiss1* w podwzgórzu. U samców z grupy KAF poziom wspomnianego transkryptu był aż o 5 razy niższy w porównaniu do samców z grupy K. Jednak, podobnie jak w przypadku samic, u samców nie stwierdzono różnic w poziomach transkryptu dla *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* oraz *Tac2* w podwzgórzu w PND 25.

Podsumowując, w eksperymencie 1 wykazano po raz pierwszy, że efekty działania diety matki na ekspresję *Kiss1* w podwzgórzu ujawniają się już bardzo wcześnie, bo już w PND 25 i są płciowo-zależne. W przypadku podwzgórzowego *Kiss1*, tylko u potomstwa płci męskiej zaobserwowane istotny statystycznie spadek poziomu *Kiss1* mRNA, stąd układ kisspetynoergiczny samców na tych wczesnych etapach rozwojowych jest bardziej wrażliwy na KAF matki.

**5.1.5. Ekspozycja na KAF matki prowadzi do płciowo-specyficznych zmian w poziomach transkryptu dla *Kiss1* i *Sirt1*, ale nie w *Gpr54*, w wątrobie potomstwa**  
Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazały również płciowo-specyficzny wpływ matczynej KAF na poziom mRNA dla *Kiss1* w wątrobie potomstwa. Poziom transkryptu dla *Kiss1* był niższy u samic z grupy KAF w PND 25 w porównaniu do grupy K. Z kolei u samców nie zaobserwowano różnic w poziomach mRNA dla *Kiss1* w wątrobie.

Płciowo-specyficzne różnice wykazano również w poziomie transkryptu dla *Sirt1* w wątrobie u potomstwa. Odwrotnie niż w przypadku mRNA dla *Kiss1*, zmiany w poziomie transkryptu dla *Sirt1* zaobserwowano tylko u samców z grupy KAF w PND 25. Samce te charakteryzowały się wyższym poziomem transkryptu w porównaniu z grupą K.

Natomiast analiza stosunku ilości mRNA dla *Sirt1/Kiss1* ujawniła nie tylko różnice pomiędzy grupami KAF i K, ale również różnice płciowo-specyficzne. Samice z grupy KAF w PND 25 charakteryzowały się prawie 2 razy mniejszym stosunkiem *Sirt1/Kiss1* w porównaniu do grupy K. Natomiast w przypadku samców to osobniki z grupy KAF cechowały się ponad 4,5 razy większym stosunkiem *Sirt1/Kiss1* w porównaniu do grupy K.

Powyższe wyniki są niezmiernie istotne zważywszy na współdziałanie pomiędzy *Kiss1* i *Sirt1* oraz rolę tych substancji w regulacji funkcji metabolicznych. Sirtuina 1 zaangażowana jest między innymi w regulację metabolizmu, a dokładniej w metabolizm

glukozy i kwasów tłuszczowych w wątrobie. Co więcej, SIRT1 może wpływać na glukoneogenezę oraz sekrecję insuliny. Wykazano, że obniżona ekspresja *Sirt1* może prowadzić do stanu zapalnego wątroby lub stłuszczenia wątroby (86, 88).

Podsumowując, badania przeprowadzone w ramach eksperymentu 1 wykazały negatywny wpływ matczynej KAF na masę i skład ciała potomstwa oraz profil metaboliczny i immunologiczny. Zaobserwowano także po raz pierwszy, że już na wczesnych etapach rozwojowych – PND 25, występują specyficzne płciowo zmiany w poziomach mRNA dla gen *Kiss1* w podwzgórzu oraz *Kiss1* i *Sirt1* w wątrobie.

## 5.2. Eksperyment 2

Wyniki eksperymentu 2 potwierdziły założoną hipotezę wpływu długotrwałej matczynej ekspozycji na KAF na wystąpienie płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym (poziom glukozy, insuliny, cholesterolu i trójglicerydów w surowicy krwi) oraz zmian związanych z dojrzewaniem i rozrodem szczurów. Po raz pierwszy pokazano wpływ matczynej KAF na opóźnienie dojrzewania płciowego u żeńskiego potomstwa. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na to, że wyżej wymienione zmiany dotyczące metabolizmu i funkcji rozrodczych u potomstwa matek KAF mogą być częściowo związane z układem *Kiss1* i *Sirt1* zarówno w podwzgórze, jak i wątrobie.

Wykazano też płciowo-specyficzne działanie matczynej KAF na poziom mRNA dla *Kiss1* oraz *Sirt1* w wątrobie potomstwa oraz na profil metaboliczny potomstwa. Wyniki eksperymentu 2 poszerzają wiedzę uzyskaną w czasie krótszej ekspozycji na KAF u młodszego potomstwa (PND 25; eksperyment 1). Podobnie jak w eksperymencie 1, w eksperymencie 2 zaobserwowano wpływ matczynej KAF na masę i skład ciała starszego potomstwa. Tym samym podsumowując wyniki eksperymentów 1 i 2 wykazano, że efekty działania KAF matki są długotrwałe.

### 5.2.1. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF obniża masę ciała, ale nie wpływa na skład ciała potomstwa

KAF podawana samicom przed ciążą (przez 10 tyg.) oraz w trakcie ciąży i laktacji wpłynęła na obniżenie masy ciała potomstwa. Już w pierwszym badanym punkcie czasowym, tj. w 4 dniu po urodzeniu (PND 4) mioty matek KAF były lżejsze w porównaniu do miotów grupy K. Co więcej, obniżona masa ciała u potomstwa samic z grupy KAF utrzymywała się w każdym z badanych punktów czasowych. Badania przeprowadzone przez Jacobs i wsp. wykazały, że potomstwo samic karmionych KAF miały wyższą masę ciała już od pierwszego dnia po urodzeniu w porównaniu do potomstwa z grupy K (17). Różnica ta utrzymywała się do momentu odstawienia młodych od matki, jednak w PND 90 nie była już obserwowana (17). Nie można jednak bezpośrednio porównywać wyników eksperymentu 2 i tych prowadzonych przez Jacobsa i wsp., gdyż niniejsze badania zakończono w PND 60. Jednak analiza składu diet wykazała istotne różnice. Wykazano również, że dieta matki uboga w białko prowadzi do zmniejszenia masy organów potomstwa, takich jak trzustka, śledziona, wątroba, czy

mięśnie (105). Ponadto udowodniono, że taka dieta przyczynia się do spadku tempa proliferacji komórek beta trzustki, obniżenia wielkości wysp trzustkowych i ich wizualizacji (106).

W eksperymencie 2 w niniejszej rozprawie doktorskiej KAF zawierała połowę mniej białka w porównaniu do diety standardowej AIN93G. Tak długie zastosowanie diety o niskiej zawartości białka może przyczyniać się do obserwowanej obniżonej masy ciała (107) i zmian w ekspresji genów w wątrobie potomstwa (108). Z drugiej strony, matczyzna otyłość, a nie KAF sama w sobie może skutkować wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu i co za tym idzie zmniejszoną masą urodzeniową (109). Dieta niskobiałkowa przyczynia się również do zmian w metylacji DNA i ekspresji wielu genów w wątrobie (108).

W eksperymencie z krótkotrwałą ekspozycją na KAF matki (eksperyment 1) wykazano spadek masy ciała i wzrost procentowej zawartości tkanki tłuszczowej w PND 25. Natomiast w badaniach z dłuższą ekspozycją na KAF matki (eksperyment 2) wykazano zmiany w procentowej zawartości tkanki tłuszczowej jedynie u potomstwa żeńskiego. W PND 35 samice z grupy KAF miały niższą procentową zawartość tkanki tłuszczowej w porównaniu do grupy K w tym samym wieku.

Podobne wnioski otrzymała grupa Buckley i wsp., gdzie matczyzna HFD wpłynęła na obniżoną masę beztłuszczową u potomstwa w wieku 3 miesięcy (110). Jednak nie zaobserwowano wpływu prenatalnej ekspozycji na HFD na całkowitą zawartość tkanki tłuszczowej u potomstwa w wieku 3 miesięcy (110). Pomimo tego, że KAF dobrze reprezentuje dietę typu zachodniego często spożywaną przez ludzi, trudno uzyskać spójne wyniki pomiędzy grupami badawczymi, ze względu na dużą różnorodność produktów możliwych do zastosowania w diecie oraz różny czas ekspozycji zwierząt na tą dietę.

### **5.2.2. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF wpływa w płciowo-specyficzny sposób na profil metaboliczny i hormonalny potomstwa**

Wyniki eksperymentu 2, podobnie jak eksperymentu 1, wykazały zmiany w profilu metabolicznym i hormonalnym u potomstwa po prenatalnej i wczesno postnatalnej ekspozycji na KAF. Zaobserwowane zostały płciowo-specyficzne różnice w poziomach glukozy i insuliny. Żeńskie potomstwo samic z grupy KAF w PND 30 miało niższy poziom glukozy w porównaniu do samic z grupy KAF w PND 60. W przypadku insuliny

wykazano, że samice z grupy KAF w PND 60 cechowały się wyższym poziomem insuliny w surowicy krwi w porównaniu do samic z grupy KAF w PND 35. Z kolei u samców, osobniki w PND 45 charakteryzowały się wyższym poziomem insuliny w surowicy krwi w porównaniu do samców z grupy KAF w PND 40.

Badania przeprowadzone przez Jacobs i wsp. wykazały niewielką różnicę w poziomie glukozy u potomstwa samic z grupy KAF w porównaniu z grupą K (17). Co więcej, różnice te nie były już obserwowane u dorosłego potomstwa. We badaniach tych zaobserwowano również wyższy poziom insuliny w surowicy krwi u dorosłego żeńskiego potomstwa matek z grupy KAF w porównaniu do grupy K (17).. W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie oraz Jacobs i wsp. (17) zwierzęta nie były głodzone przed pobraniem materiału do badań, aby uniknąć dodatkowego czynnika stresującego.

Jeśli chodzi o profil metaboliczny, to największe różnice zaobserwowano w poziomach cholesterolu oraz trójglicerydów w surowicy krwi, które były wyższe zarówno u samic jak i samców matek z grupy KAF w porównaniu do grupy K. Wpływ KAF na poziom trójglicerydów u potomstwa wykazały także badania Jacobs i wsp. (17). U dorosłego potomstwa matek utrzymywanych na KAF przed ciążą (10 tyg.) oraz w trakcie ciąży i laktacji zaobserwowano wyższy poziom trójglicerydów w porównaniu do grupy K. Jednak, w tej samej grupie zwierząt nie wykazano różnic w poziomie cholesterolu w porównaniu do grupy K (17).

Podsumowując, eksperyment 2 przeprowadzony w ramach rozprawy doktorskiej potwierdził wpływ matczynej KAF na wystąpienie zmian w parametrach profilu metabolicznego u potomstwa. Ponadto poszerzył on wyniki krótszej ekspozycji na KAF u młodszego potomstwa opisanych w eksperymencie 1.

### **5.2.3. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF prowadzi do zależnych od płci zmian w profilu hormonalnym potomstwa**

Wykazano, że prenatalna ekspozycja na KAF wpływa także na funkcje rozrodcze potomstwa prowadząc do zmian w profilu hormonalnym. Wyniki eksperymentu 2 wykazały wzrost poziomu testosteronu wraz z wiekiem zarówno u samców z grupy KAF, jak i K. Jednak zmiany te nie były mniejsze u samców z grupy KAF w porównaniu do samców z grupy K. Dodatkowo, u potomstwa męskiego

zaobserwowano wzrost poziomu LH w surowicy krwi wraz z wiekiem. Dalsza analiza ujawniła, że tylko w grupie KAF samców poziom LH był wyższy w PND 45 oraz 60 w porównaniu do PND 40. Podobnie jak w przypadku samców, u samic zarówno z grupy KAF jak i z grupy K zaobserwowano wzrost LH w surowicy krwi. U samic z obu grupy poziom LH był wyższy w PND 60 w porównaniu do PNDs 35 i 30. W przypadku poziomu estrogenu u potomstwa samic nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w żadnym punkcie czasowym.

Podsumowując, matczyzna KAF wpływa na poziom testosteronu u męskiego potomstwa oraz LH u potomstwa męskiego i żeńskiego. Nie wykazano natomiast statystycznie istotnego wpływu na poziom estrogenu. Choć należy tutaj zaznaczyć, że o ile poziom testosteronu jest bardziej stabilny, to poziom estrogenu ulega szybkim zmianom w cyklu płciowym. Pomimo kontroli cyklu płciowego samic, które były uśmiercane w dieastrus, możliwe są wahania tego hormonu od czasu wykonania wymazu (w godzinach wczesno rannych) i określenia fazy cyklu płciowego, do czasu pobrania materiału (godziny ranne i wczesno popołudniowe). W przeciwieństwie do badań przeprowadzonych przez Jacobs i wsp. na dorosłych (PND 90) samcach po prenatalnej ekspozycji na KAF, w niniejszych badaniach nie zaobserwowano obniżonego poziomu testosteronu i LH w porównaniu do potomstwa grupy K (17). Rozbieżności te mogą wynikać z innej kompozycji KAF, wieku badanych zwierząt, a także wykorzystanych innych testów do pomiaru T i LH w surowicy krwi.

#### **5.2.4. Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF prowadzi do opóźnionego dojrzewania płciowego samic oraz upośledzenia funkcji rozrodczych u potomstwa samców. Zmiany te mogą przynajmniej częściowo wynikać z zakłócenia proporcji mRNA dla *Kiss1/Sirt1* w podwzgórzu u potomstwa KAF w porównaniu z K.**

Istnieje wiele dowodów wpływu diety indukującej otyłość na zaburzenia rozpoczęcia dojrzewania. HFD podawana szczurom w trakcie ciąży (111) lub w trakcie ciąży i laktacji (112-114) wpływa na rozpoczęcie dojrzewania płciowego oraz na dysfunkcje układu rozrodczego (rozregulowany cykl rujowy) żeńskiego potomstwa. Dojrzewanie płciowe, a także reprodukcja są procesami wymagającymi zwiększonego nakładu energetycznego organizmu w szczególności u samic. Dlatego też rozpoczęcie dojrzewania płciowego jest ściśle związane ze statusem energetycznym organizmu.



Dysfunkcje w statusie energetycznym i metabolicznym mogą natomiast prowadzić do zaburzeń związanych z dojrzewaniem i rozrodem (86).

Mechanizmy odpowiedzialne za zmiany w funkcjonowaniu układu rozrodczego zlokalizowane są w podwzgórzu mózgu. Jednym z nich jest zwiększona liczba neuronów KP w jądrze łukowatym (ARC) podwzgórza, którą obserwuje się w czasie dojrzewania płciowego (115). Badania przeprowadzone na rebusach wykazały również wpływ diety wysokokalorycznej na podwyższenie indeksu masy ciała (BMI) oraz wcześniejszego wystąpienia pierwszej rui w porównaniu do grupy K (116). Podobna sytuacja ma miejsce u otyłych dziewczynek, u których zwiększona masa ciała wpływa na przyspieszenie dojrzewania płciowego i wcześniejszego wystąpienia pierwszego krwawienia miesięcznego (117). Badania dotyczące chłopców nie są jednak tak spójne. Co prawda w kilku badaniach przeprowadzonych na chłopcach zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy zawartością tkanki tłuszczowej a przyspieszonym dojrzewaniem płciowym (117-119). Jednak, istnieją także doniesienie, w których wykazano brak związku pomiędzy zawartością tkanki tłuszczowej a rozpoczęciem dojrzewania płciowego (120, 121) lub nawet opóźnione dojrzewanie u otyłych chłopców (122, 123).

Powyższe badania przeprowadzone zarówno na zwierzętach, jak i obserwacje kliniczne wskazują na istnienie wpływu diety matki na dojrzewanie płciowe oraz funkcje rozrodcze u potomstwa.

Choć istnieje wiele dowodów dotyczących wpływu diety wysokotłuszczowej prowadzącej do otyłości na rozpoczęcie procesów związanych z dojrzewaniem płciowym, to niniejsze badania jako pierwsze ukazują wpływ matczynej KAF, która dobrze odwzorowuje dietę typu zachodniego, na opóźnienie dojrzewania płciowego u żeńskiego potomstwa. U żeńskiego potomstwa samic z grupy KAF do rozwarcia pochwy (tj. zewnętrzny marker rozpoczęcia dojrzewania płciowego) dochodziło trzy dni później w porównaniu do potomstwa samic z grupy K. Z drugiej strony, badania przeprowadzone przez Galarza i wsp. na samicach szczura Sprague Dawley wykazały, że u żeńskiego potomstwa matek utrzymywanych na KAF prowadzącej do osiągnięcia 30 % otyłości w porównaniu do grupy K, dochodziło do rozwarcia pochwy trzy dni wcześniej niż u grupy K (72). Różnice w otrzymanych wynikach mogą wynikać z wykorzystania innego szczepu szczurów w eksperymentach oraz różnego czasu podawania KAF matkom przed okresem ciąży, jak i składu diety, w tym zawartości białka.

W poszukiwaniu mechanizmu, który może być odpowiedzialny za obserwowane efekty skupiono się na KP oraz SIRT1. U samic nie zaobserwowano zmian związanych z wiekiem dla poziomu mRNA dla *Kiss1* oraz *Gpr54*. Ponieważ SIRT1 jest białkiem, które na drodze represji epigenetycznej genu *Kiss1* w podwzgórzu blokuje dojrzewanie płciowe zbadano wzajemne interakcje pomiędzy poziomem transkryptu *Sirt1* oraz *Kiss1*. Zaobserwowano zmiany w stosunku mRNA *Sirt1/Kiss1* związane z wiekiem u samic po matkach KAF w porównaniu do grupy K. Zmiany w stosunku mRNA *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu również mogły przyczynić się do opóźnienia dojrzewania płciowego u samic z grupy KAF. Stosunek *Sirt1/Kiss1* w PND 30 był niższy w grupie KAF w porównaniu do grupy K, w PND 35 nie wykazano różnic pomiędzy grupami, jednak w PND 60 stosunek *Sirt1/Kiss1* był wyższy u samic z grupy KAF w porównaniu do grupy K.

W przeciwieństwie do samic, u samców w podwzgórzu zaobserwowano wyższy poziom transkryptu dla *Kiss1* w PND 40 oraz 45 w porównaniu do PND 60, co związane jest z dojrzewaniem płciowym we wcześniejszych punktach czasowych, którym towarzyszy wzrost *Kiss1*. Nie wykazano jednak różnic pomiędzy grupą KAF i K. Stwierdzono natomiast, że w PND 45 poziom mRNA dla *GPR54* był niższy w grupie KAF w porównaniu z grupą K. Podobnie do *Kiss1*, w PND 40 i 45 nie wykazano różnic w proporcjach *Sirt1/Kiss1* pomiędzy badanymi grupami KAF i K. Różnice te ujawniono dopiero w PND 60, gdzie proporcja *Sirt1/Kiss1* była mniejsza dla grupy KAF w porównaniu z grupą K, co by wskazywało na wpływ diety na *Sirt1/Kiss1* w okresie dorosłym. Jednakże, możliwy jest również scenariusz, w którym nie wychwycono momentu maksymalnego wzrostu poziomu mRNA dla *Kiss1*, gdyż mógł on wystąpić wcześniej, pomiędzy PND 25 a 30 (61).

Powyższe badania wskazują na wpływ matczynej KAF na wystąpienie płciowo-specyficznych różnic w stosunku mRNA *Sirt1/Kiss1* potomstwa w podwzgórzu.

Dowiedziano również, że matczyna otyłość indukowana wysokokaloryczną dietą podawaną przez 6 tygodni przed ciążą oraz w trakcie ciąży i laktacji prowadzi do płciowo-specyficznych różnic u potomstwa szczurów w poziomie *Kiss1* (124). Zaobserwowano obniżenie ekspresji *Kiss1* w ARC oraz AVPV w PND 100 tylko u potomstwa żeńskiego. Natomiast nie wykazano wpływu diety wysokotłuszczowej na poziom ekspresji *Kiss1* w ARC oraz AVPV w PND 30. Stąd też można wnioskować, że

zarówno czas podawania diety, jej skład, różnice w badanych punktach czasowych oraz badanie zmian w całym podwzgórzu, jak w osobno w jądrach ARC i AVPC mogą istotnie wpływać na uzyskane wyniki.

Płciowo-specyficzne różnice zostały także zaobserwowane w poziomie transkryptu dla *Sirt1* w podwzgórzu u potomstwa. Tylko samice z grupy KAF charakteryzowały się wyższym poziomem mRNA dla *Sirt1* występującym wraz z wiekiem w podwzgórzu (PND 60 > PND 30 oraz PND 60 > PND 35).

Podsumowując, badania wykazały wpływ matczynej KAF na opóźnienie dojrzewania płciowego u potomstwa żeńskiego, co mogło być związane ze zmianami w poziomie transkryptu dla *Sirt1* oraz ze zmianami wiekowo-zależnymi zmianami w stosunku mRNA *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu. Natomiast zaobserwowane zmiany (zmiany w poziomie transkryptu dla *Gpr54* w podwzgórzu w PND 45 oraz zmiany w stosunku mRNA *Sirt1/Kiss1* w dorosłości - PND 60) mogą przyczyniać do dysfunkcji rozrodczych samców po matkach z grupy KAF. Zmiany te mogą przejawiać się na poziomie funkcjonowania gonad, co jednak wymaga przeprowadzenia dalszych analiz.

#### **5.2.5. Długotrwała ekspozycja na KAF matki nie wpływa na poziom mRNA dla *Pdyn* oraz *Tac2* w podwzgórzu potomstwa**

Jak już zostało wspomniane we wstępie niniejszej rozprawy, KP w podwzgórzu ulega koekspresji wraz z neurokininą B oraz dynorfiną A. Dlatego też postanowiono zbadać wpływ KAF na poziom mRNA dla genów kodujących te peptydy. Jednakże, nie zaobserwowano zmian w poziomie transkryptu dla *Tac2* oraz *Pdyn* w podwzgórzu u potomstwa. Z drugiej strony, badania przeprowadzone z wykorzystaniem HFD podawanej matkom wykazały różnice w poziomie mRNA dla *Pdyn* u potomstwa. W PND 15 transkrypt dla *Pdyn*, podobnie jak poziom białka w AVPV był wyższy u potomstwa po matkach HFD w porównaniu do grupy K (125). Chang i wsp. sugerowali, że matczyzna dieta wpływa na stymulację proliferacji prekursorów neuronów oraz ich migrację do podwzgórza (125). W niniejszych badaniach prezentowanych w rozprawie doktorskiej badane było całe podwzgórze potomstwa, a nie poszczególne jądra podwzgórza, dlatego nie można bezpośrednio porównać wyników z wyżej przywołanymi.

W eksperymencie 2 nie wykazano także wpływu matczynej KAF na poziom mRNA dla *Tac2* w podwzgórzu u potomstwa. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Kim i wsp. na szczurach Sprague-Dawley zaobserwowano, że prenatalna i wczesno postnatalna ekspozycja na HFD wpływa na zwiększenie gęstości neuronów NKB w ARC podwzgórza (126). Jednak, kiedy po osiągnięciu dojrzałości płciowej, samice otrzymywały dietę standardową zamiast HFD, w PND 85 nie wykazano już różnic w gęstości neuronów NKB w podwzgórzu w porównaniu do grupy K. Badania przeprowadzone na szczurach Sprague-Dawley przez Li i wsp. pokazały postnatalny wpływ HFD na przyspieszenie dojrzewania płciowego oraz na wyższy poziom ekspresji *NKB* mRNA w ARC w porównaniu do grupy K (127). Rola NKB w procesach związanych z rozpoczęciem dojrzewania płciowego została również potwierdzona w badaniach przeprowadzonych przy wykorzystaniu nokaucie genu *Tac2* (128). Samice myszy Sv129/C57BL/6 z nokautem *Tac2*<sup>-/-</sup> wykazywały opóźnienie w osiągnięciu dojrzałości płciowej w porównaniu z grupą K (128).

Natomiast badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wskazują brak wpływu matczynej KAF na poziomie mRNA dla *Tac2* potomstwa w podwzgórzu.

#### **5.2.6. Długotrwała ekspozycja na KAF matki w płciowo-specyficzny sposób wpływa na zmiany w poziomie mRNA dla *Kiss1* oraz *Sirt1* w wątrobie potomstwa**

W niniejszych badaniach podobnie jak w podwzgórzu, wykazano również płciowo-specyficzne zmiany w poziomie mRNA dla *Kiss1* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa. Męskie potomstwo z grupy KAF charakteryzowało się wyższym poziomem transkryptu dla *Kiss1* w PND 60 i niższym poziomem transkryptu dla *Sirt1* w PND 45 w porównaniu do grupy K. W przypadku potomstwa żeńskiego nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian pomiędzy grupami KAF i K. Dodatkowo tylko u potomstwa męskiego stwierdzono, że poziom mRNA dla *Gpr54* w wątrobie był niższy w grupie KAF w PND 60 w porównaniu do PND 40.

Badania te są zgodne z poprzednimi eksperymentami przeprowadzonymi na dorosłych szczurach Wistar z indukowaną T2DM poprzez HFD oraz iniekcję streptozotocyny (129). Samce z T2DM miały wyższy poziom KP w wątrobie porównaniu do grupy K (129). Na podstawie cytowanych już wcześniej badań przeprowadzonych przez Song i wsp.,

wynika, że wzrost produkcji KP w wątrobie może przyczyniać się do zaburzeń w sekrecję insuliny z trzustki i rozwoju T2DM (87). Wcześniejsze badania prowadzone w Pracowni Neurobiologii również wykazały płciowo-specyficzne różnice w ekspresji mRNA dla *Kiss1/Kiss1r* w wątrobie u dorosłych szczurów z T2DM (130). U samic zaobserwowano wzrost w poziomie mRNA dla *Kiss1/Kiss1r* w wątrobie, jednak u samców nie wykazano takich różnic. Dodatkowo, ujawniono, że u dorosłych samic w wątrobie, promotor genu dla *Kiss1r* charakteryzował się podwyższoną metylacją, sugerując wyciszenie tego genu. Faktycznie, obserwacja hipermetylacji promotora genu *Kiss1r* miała związek z obniżonym poziomem białka KISS1R w wątrobie samic z T2DM (130).

W poszukiwaniu fizjologicznego znaczenia wpływu KAF na zmiany w poziomach mRNA dla *Kiss1* u męskiego potomstwa odwołano się do hipotezy hormonalnego układu trzustka-wątroba zaproponowanej przez Song i wsp. (87). W tym modelu w przypadku wysokiego poziomu glukagonu we krwi, który jest wczesnym objawem T2DM, obserwuje się wysoki poziom wątrobowej KP. Wątrobowa KP tłumiałaby wówczas stymulowane glukozą wydzielanie insuliny. W eksperymencie 2 u samców w PND 60 również zaobserwowano stosunkowo wysoki poziom *Kiss1* mRNA (w porównaniu z samicami), natomiast nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w poziomie insuliny w porównaniu z grupą K. Jest prawdopodobne, że przeprowadzenie pomiarów poziomu insuliny u głodzonych zwierząt mogłoby doprowadzić do ujawnienia istotnych statystycznie różnic między grupami.

W przypadku badań na próbkach wątroby przeprowadzony eksperyment jednoznacznie wskazuje na wykazanie płciowo-specyficznych różnic w odpowiedzi potomstwa na KAF matki. Potomstwo płci męskiej wydaje się być bardziej wrażliwe na KAF w przypadku wątrobowego mRNA dla *Kiss1* w PND 60 oraz mRNA dla *Sirt1* w PND 45.

Niniejsze badania po raz pierwszy pokazały płciowo-specyficzne zmiany w poziomie transkryptu dla *Sirt1* obserwowane wraz z wiekiem u męskiego potomstwa z grupy KAF oraz obniżenie poziom transkryptu dla *Sirt1* w PND 45 w porównaniu do grupy K. Badania przeprowadzone przez Borengasser i wsp. wykazały wysoką supresję ekspresji genu dla *Sirt1* u męskiego potomstwa w PND 35 po ekspozycji na matczyną HFD oraz utrzymywaniu na HFD przez dwa tygodnie po odstawieniu od matek (131). Co

więcej, obserwowany spadek poziomu SIRT1 związany był ze wzrostem ekspresji genu dla enzymu EZH2, która skutkowałą wzrostem metylacji w H3K27me3. Gen dla enzymu EZH2 uczestniczy w metylacji histonów co prowadzi do represji ekspresji genów (132). Powyższe badania wskazują na wpływ HFD na SIRT1 poprzez mechanizmy epigenetyczne. Badania przeprowadzone na makakach eksponowanych na HFD w trakcie ciąży wykazały obniżoną ekspresję SIRT1 w wątrobie płodów (133). Spadek ekspresji SIRT1 występował łącznie ze wzrostem acetylacji histonu H3 (H3K14ac) (133). Grupa Nicholas i wsp. wykazała natomiast, że otyłość owiec w okresie około koncepcyjnym prowadzi do wzrostu poziomu SIRT1 w wątrobie potomstwa (134). Rola SIRT1 w kontroli wątrobowego metabolizmu lipidów została również potwierdzona w specyficznej dla wątroby delecji SIRT1 w modelu warunkowego znokautowania, w którym myszy wykazują przyrost masy ciała i stłuszczenie wątroby w odpowiedzi na zachodnią dietę (135).

Wyniki powyższych badań wskazują więc na zaangażowanie SIRT1 w epigenetyczne zmiany w wątrobie w odpowiedzi na HFD oraz T2DM. Mogą one sugerować, że podobne mechanizmy obecne w przypadku ekspozycji na KAF. Ponadto niezwykle ciekawym tematem badawczym wydają się być interakcje pomiędzy KP i SIRT1 w wątrobie. Mogą one w znacznym stopniu poszerzyć wiedzę na temat roli SIRT1 nie tylko w procesach związanych z dojrzewaniem płciowym oraz aktywacją KP (63), ale również w regulacji metabolizmu.

Podsumowując, w przeprowadzonym eksperymencie 2 udowodniono długotrwały i płciowo-specyficzny wpływ matczynej KAF na profil metaboliczny oraz hormonalny potomstwa. Co więcej, KAF prowadzi do obniżenia masy ciała i zmiany składu ciała u potomstwa. Po raz pierwszy wykazano również, że matczyzna KAF powoduje opóźnienie rozpoczęcia dojrzewania płciowego potomstwa płci żeńskiej. Zaproponowano także mechanizmy tych zmian, które mogą być przynajmniej częściowo związane z systemami KP i SIRT1 w podwzgórzu i wątrobie.

## VI Podsumowanie i wnioski

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów na szczurach w modelu krótkotrwałej (Eksperyment 1) i długotrwałej (Eksperyment 2) ekspozycji na KAF matki wykazano jej negatywny wpływ na parametry metaboliczne, hormonalne oraz profil immunologiczny potomstwa. Ponadto udowodniono, że większość z tych zmian jest płciowo-zależna. Wyniki przeprowadzonych badań również sugerują, że zaburzenia w układzie Kiss1/Sirt1 wywołane KAF matki mogą przyczyniać się do obserwowanych zmian funkcji metabolicznych rozrodczych.

Wyciągnięto następujące wnioski:

- 1) Potomstwo matek z grupy KAF charakteryzuje się obniżoną masą ciała oraz zaburzeniami składu ciała.
- 2) Ekspozycja samic na KAF przed ciążą oraz w okresie prenatalnym i wczesno postnatalnym prowadzi do wystąpienia płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym, hormonalnym i immunologicznym potomstwa.
- 3) Potomstwo płci żeńskiej jest bardziej wrażliwe na efekty krótkotrwałej ekspozycji na KAF matki w przypadku parametrów metabolicznych i immunologicznych.
- 4) Po raz pierwszy udowodniono, że już na bardzo wczesnych etapach rozwoju, bo w PND 25, KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla *Kiss1* w podwzgórzu oraz poziomie transkryptu dla *Kiss1* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa.
- 5) Po raz pierwszy pokazano, że długotrwała ekspozycja na KAF przed ciążą oraz w okresie prenatalnym i wczesno postnatalnym przyczynia się do opóźnienia dojrzewania płciowego potomstwa żeńskiego.
- 6) Zmiany w stosunku *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu i w wątrobie potomstwa mogą przyczyniać się do obserwowanych płciowo-specyficznych efektów metabolicznych i zaburzeń funkcji układu rozrodczego spowodowanych ekspozycją na KAF matki.

## VII Literatura

1. Abbasi J. Study Puts Eggs and Dietary Cholesterol Back on the Radar. *JAMA*. 2019;321(20):1959-61.
2. WHO. [https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1) 2023 [
3. Pugazhenti S, Qin L, Reddy PH. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1037-45.
4. Lainez NM, Coss D. Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function. *Endocrinology*. 2019;160(11):2719-36.
5. Thong EP, Codner E, Laven JSE, Teede H. Diabetes: a metabolic and reproductive disorder in women. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(2):134-49.
6. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7.
7. Grzeda E, Matuszewska J, Ziarniak K, Gertig-Kolasa A, Krzysko-Pieczka I, Skowronska B, et al. Animal Foetal Models of Obesity and Diabetes - From Laboratory to Clinical Settings. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:785674.
8. Phillips DI, Barker DJ, Fall CH, Seckl JR, Whorwood CB, Wood PJ, et al. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):757-60.
9. Phillips DI, Walker BR, Reynolds RM, Flanagan DE, Wood PJ, Osmond C, et al. Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 populations. *Hypertension*. 2000;35(6):1301-6.
10. Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D. Diet before and during Pregnancy and Offspring Health: The Importance of Animal Models and What Can Be Learned from Them. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(6).
11. Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. Preclinical models for obesity research. *Dis Model Mech*. 2016;9(11):1245-55.
12. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*. 1979;59(3):719-809.
13. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(3):140-62.



14. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012;Chapter 5:Unit5 61.
15. Pinheiro-Castro N, Silva L, Novaes GM, Ong TP. Hypercaloric Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Experimental Models. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1134:149-61.
16. Halton TL, Willett WC, Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, Hu FB. Potato and french fry consumption and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):284-90.
17. Jacobs S, Teixeira DS, Guilherme C, da Rocha CF, Aranda BC, Reis AR, et al. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiol Behav.* 2014;129:280-6.
18. Rothwell NJ, Saville ME, Stock MJ. Effects of feeding a "cafeteria" diet on energy balance and diet-induced thermogenesis in four strains of rat. *J Nutr.* 1982;112(8):1515-24.
19. Sampey BP, Vanhose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(6):1109-17.
20. Mucellini AB, Goularte JF, de Araujo da Cunha AC, Caceres RC, Noschang C, da Silva Benetti C, et al. Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats. *Br J Nutr.* 2014;111(8):1499-506.
21. Bridge-Comer PE, Vickers MH, Reynolds CM. Preclinical Models of Altered Early Life Nutrition and Development of Reproductive Disorders in Female Offspring. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1134:59-87.
22. Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, et al. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:254-61.
23. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav.* 2016;167:382-91.

24. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res.* 2015;64(7):501-12.
25. de Melo AF, Moreira CCL, Sales CF, Rentz T, Raposo HF, Garofalo MAR, et al. Increase in liver cytosolic lipases activities and VLDL-TAG secretion rate do not prevent the non-alcoholic fatty liver disease in cafeteria diet-fed rats. *Biochimie.* 2018;150:16-22.
26. Feijo GDS, de Oliveira S, Thoen R, Schaab EE, de Moura AC, Franco F, et al. Food Selection of Cafeteria Diet Affects Memory Dysfunction Related to Obesity. *Neurochem Res.* 2019;44(8):1869-77.
27. Gasparin FRS, Carreno FO, Mewes JM, Gilglioni EH, Pagadigorria CLS, Natali MRM, et al. Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(7):2495-509.
28. Maeda Junior AS, Constantin J, Utsunomiya KS, Gilglioni EH, Gasparin FRS, Carreno FO, et al. Cafeteria Diet Feeding in Young Rats Leads to Hepatic Steatosis and Increased Gluconeogenesis under Fatty Acids and Glucagon Influence. *Nutrients.* 2018;10(11).
29. Gastiazoro MP, Guerrero-Schimpf M, Durando M, Lazzarino GP, Andreoli MF, Zierau O, et al. Induction of uterine hyperplasia after cafeteria diet exposure. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;477:112-20.
30. Lalanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallas M, et al. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One.* 2014;9(1):e85049.
31. Warneke W, Klaus S, Fink H, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;116:45-54.
32. Lai M, Chandrasekera PC, Barnard ND. You are what you eat, or are you? The challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes. *Nutr Diabetes.* 2014;4(9):e135.
33. Rogers PJ. Returning 'cafeteria-fed' rats to a chow diet: negative contrast and effects of obesity on feeding behaviour. *Physiol Behav.* 1985;35(4):493-9.

34. Sclafani A, Aravich PF, Landman M. Vagotomy blocks hypothalamic hyperphagia in rats on a chow diet and sucrose solution, but not on a palatable mixed diet. *J Comp Physiol Psychol*. 1981;95(5):720-34.
35. Bayol SA, Simbi BH, Bertrand JA, Stickland NC. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. *J Physiol*. 2008;586(13):3219-30.
36. George G, Draycott SAV, Muir R, Clifford B, Elmes MJ, Langley-Evans SC. Exposure to maternal obesity during suckling outweighs in utero exposure in programming for post-weaning adiposity and insulin resistance in rats. *Sci Rep*. 2019;9(1):10134.
37. Pomar CA, van Nes R, Sanchez J, Pico C, Keijer J, Palou A. Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. *Int J Obes (Lond)*. 2017;41(8):1279-87.
38. Vithayathil MA, Gugusheff JR, Ong ZY, Langley-Evans SC, Gibson RA, Muhlhausler BS. Exposure to maternal cafeteria diets during the suckling period has greater effects on fat deposition and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) gene expression in rodent offspring compared to exposure before birth. *Nutr Metab (Lond)*. 2018;15:17.
39. Sagae SC, Menezes EF, Bonfleur ML, Vanzela EC, Zacharias P, Lubaczeuski C, et al. Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiol Behav*. 2012;105(5):1104-11.
40. Bazzano MV, Torelli C, Pustovrh MC, Paz DA, Elia EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(5):655-67.
41. Langley-Evans SC. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet*. 2015;28 Suppl 1:1-14.
42. Li M, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:592408.
43. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(3):525-34.

44. Navarro ME, Santos KC, Nascimento AF, Francisqueti FV, Minatel IO, Pierine DT, et al. Renal inflammatory and oxidative and metabolic changes after 6 weeks of cafeteria diet in rats. *J Bras Nefrol.* 2016;38(1):9-14.
45. Pantham P, Aye IL, Powell TL. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta.* 2015;36(7):709-15.
46. Basu S, Haghiac M, Surace P, Challier JC, Guerre-Millo M, Singh K, et al. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(3):476-82.
47. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta.* 2008;29(3):274-81.
48. Madan JC, Davis JM, Craig WY, Collins M, Allan W, Quinn R, et al. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. *Cytokine.* 2009;47(1):61-4.
49. Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *Biomed Res Int.* 2014;2014:418975.
50. Crew RC, Waddell BJ, Mark PJ. Maternal obesity induced by a 'cafeteria' diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation. *Placenta.* 2016;39:33-40.
51. Cruz-Carrillo G, Montalvo-Martinez L, Cardenas-Tueme M, Bernal-Vega S, Maldonado-Ruiz R, Resendez-Perez D, et al. Fetal Programming by Methyl Donors Modulates Central Inflammation and Prevents Food Addiction-Like Behavior in Rats. *Front Neurosci.* 2020;14:452.
52. Montalvo-Martinez L, Cruz-Carrillo G, Maldonado-Ruiz R, Trujillo-Villarreal LA, Cardenas-Tueme M, Viveros-Contreras R, et al. Transgenerational Susceptibility to Food Addiction-Like Behavior in Rats Associates to a Decrease of the Anti-Inflammatory IL-10 in Plasma. *Neurochem Res.* 2022;47(10):3093-103.
53. Ingvorsen C, Brix S, Ozanne SE, Hellgren LI. The effect of maternal Inflammation on foetal programming of metabolic disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2015;214(4):440-9.
54. Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 1980;36:53-88.
55. Lovejoy DA. *Neuroendocrinology: An Integrated Approach: Reproduction:* John Wiley & Sons; 2005. 400 p.

56. Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(1):278-82.
57. Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1971;43(6):1334-9.
58. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10972-6.
59. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614-27.
60. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(23):1731-7.
61. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*. 2004;145(10):4565-74.
62. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010;151(8):3479-89.
63. Vazquez MJ, Toro CA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Roa J, Beiroa D, et al. SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression. *Nat Commun*. 2018;9(1):4194.
64. D'Angelo S, Mele E, Di Filippo F, Viggiano A, Meccariello R. Sirt1 Activity in the Brain: Simultaneous Effects on Energy Homeostasis and Reproduction. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(3).
65. Brioude F, Bouligand J, Francou B, Fagart J, Roussel R, Viengchareun S, et al. Two families with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism and biallelic mutations in KISS1R (KISS1 receptor): clinical evaluation and molecular characterization of a novel mutation. *PLoS One*. 2013;8(1):e53896.

66. Novaira HJ, Sonko ML, Hoffman G, Koo Y, Ko C, Wolfe A, et al. Disrupted kisspeptin signaling in GnRH neurons leads to hypogonadotrophic hypogonadism. *Mol Endocrinol*. 2014;28(2):225-38.
67. Narayanaswamy S, Jayasena CN, Ng N, Ratnasabapathy R, Prague JK, Papadopoulou D, et al. Subcutaneous infusion of kisspeptin-54 stimulates gonadotrophin release in women and the response correlates with basal oestradiol levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;84(6):939-45.
68. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017;20(5):476-94.
69. Kurian JR, Keen KL, Guerriero KA, Terasawa E. Tonic control of kisspeptin release in prepubertal monkeys: implications to the mechanism of puberty onset. *Endocrinology*. 2012;153(7):3331-6.
70. Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Goto Y, Jin J, Sawai K, et al. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. *Anim Sci J*. 2012;83(6):487-92.
71. Sliwowska JH, Ziarniak K, Dudek M, Matuszewska J, Tena-Sempere M. Dangerous liaisons for pubertal maturation: the impact of alcohol consumption and obesity on the timing of puberty. *Biol Reprod*. 2019;100(1):25-40.
72. Galarza RA, Rhon Calderon EA, Cortez AE, Faletti AG. Maternal Overweight Disrupts the Sexual Maturation of the Offspring. *Reprod Sci*. 2017;24(9):1284-92.
73. Kalem Z, Kalem MN, Anado E, Bakirarar B, Yilmaz C, Elmas C, et al. Maternal nutrition and reproductive functions of female and male offspring. *Reproduction*. 2018;156(4):353-64.
74. Dudek M, Ziarniak K, Sliwowska JH. Kisspeptin and Metabolism: The Brain and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:145.
75. Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*. 2006;147(10):4852-62.
76. Gaytan F, Gaytan M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, et al. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(3):E520-31.

77. Gaytan M, Castellano JM, Roa J, Sanchez-Criado JE, Tena-Sempere M, Gaytan F. Expression of KiSS-1 in rat oviduct: possible involvement in prevention of ectopic implantation? *Cell Tissue Res.* 2007;329(3):571-9.
78. Pinto FM, Cejudo-Roman A, Ravina CG, Fernandez-Sanchez M, Martin-Lozano D, Illanes M, et al. Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2012;35(1):63-73.
79. Ricu MA, Ramirez VD, Paredes AH, Lara HE. Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology.* 2012;153(10):4966-77.
80. Meneghini MA, Galarza RA, Flores Quiroga JP, Faletti AG. Diet-induced maternal obesity and overnutrition cause a decrease in the sperm quality of the offspring. *J Nutr Biochem.* 2022;103:108966.
81. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci.* 2008;28(35):8691-7.
82. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 2006;147(12):5817-25.
83. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1235-316.
84. Rudolph LM, Bentley GE, Calandra RS, Paredes AH, Tesone M, Wu TJ, et al. Peripheral and Central Mechanisms Involved in the Hormonal Control of Male and Female Reproduction. *J Neuroendocrinol.* 2016;28(7).
85. Aylwin CF, Lomniczi A. Sirtuin (SIRT)-1: At the crossroads of puberty and metabolism. *Curr Opin Endocr Metab Res.* 2020;14:65-72.
86. Vazquez MJ, Velasco I, Tena-Sempere M. Novel mechanisms for the metabolic control of puberty: implications for pubertal alterations in early-onset obesity and malnutrition. *J Endocrinol.* 2019;242(2):R51-R65.
87. Song WJ, Mondal P, Wolfe A, Alonso LC, Stamateris R, Ong BW, et al. Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion. *Cell Metab.* 2014;19(4):667-81.

88. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1479-514.
89. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2007;80(2):84-97.
90. Smithson M, Verkuilen J. A better lemon squeezer? Maximum-likelihood regression with beta-distributed dependent variables. *Psychol Methods.* 2006;11(1):54-71.
91. Bates DM, Bolker, B., Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software.* 2015;61(1):1-48.
92. Wickham H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* 2nd Edition ed: New York: Springer; 2009.
93. Sanchez-Blanco C, Amusquivar E, Bispo K, Herrera E. Influence of cafeteria diet and fish oil in pregnancy and lactation on pups' body weight and fatty acid profiles in rats. *Eur J Nutr.* 2016;55(4):1741-53.
94. Cardenas-Perez RE, Fuentes-Mera L, de la Garza AL, Torre-Villalvazo I, Reyes-Castro LA, Rodriguez-Rocha H, et al. Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutr Metab (Lond).* 2018;15:38.
95. Bayol SA, Simbi BH, Stickland NC. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol.* 2005;567(Pt 3):951-61.
96. Raipuria M, Bahari H, Morris MJ. Effects of maternal diet and exercise during pregnancy on glucose metabolism in skeletal muscle and fat of weanling rats. *PLoS One.* 2015;10(4):e0120980.
97. Capobianco E, Pirrone I. Paternal programming of fetoplacental and offspring metabolic disorders. *Placenta.* 2023.
98. Lecorguille M, Teo S, Phillips CM. Maternal Dietary Quality and Dietary Inflammation Associations with Offspring Growth, Placental Development, and DNA Methylation. *Nutrients.* 2021;13(9).
99. Ong ZY, Muhlhausler BS. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J.* 2011;25(7):2167-79.



100. Gil-Cardoso K, Gines I, Pinent M, Ardevol A, Terra X, Blay M. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr.* 2017;117(2):218-29.
101. Gonzalez-Quilen C, Gil-Cardoso K, Gines I, Beltran-Debon R, Pinent M, Ardevol A, et al. Grape-Seed Proanthocyanidins are Able to Reverse Intestinal Dysfunction and Metabolic Endotoxemia Induced by a Cafeteria Diet in Wistar Rats. *Nutrients.* 2019;11(5).
102. Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond).* 2008;32 Suppl 7(Suppl 7):S52-4.
103. Makowski L, Hotamisligil GS. Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr.* 2004;134(9):2464S-8S.
104. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11 Suppl 1):S64-73.
105. Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr.* 1996;76(4):591-603.
106. Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate.* 1990;57(2):107-18.
107. Maloney CA, Gosby AK, Phuyal JL, Denyer GS, Bryson JM, Caterson ID. Site-specific changes in the expression of fat-partitioning genes in weanling rats exposed to a low-protein diet in utero. *Obes Res.* 2003;11(3):461-8.
108. Chmurzynska A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutr Rev.* 2010;68(2):87-98.
109. Akyol A, McMullen S, Langley-Evans SC. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. *Br J Nutr.* 2012;107(7):964-78.
110. Buckley AJ, Keseru B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism.* 2005;54(4):500-7.
111. Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Lippman M. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9372-7.

112. Connor KL, Vickers MH, Beltrand J, Meaney MJ, Sloboda DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *J Physiol*. 2012;590(9):2167-80.
113. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PLoS One*. 2009;4(8):e6744.
114. Tsoulis MW, Chang PE, Moore CJ, Chan KA, Gohir W, Petrik JJ, et al. Maternal High-Fat Diet-Induced Loss of Fetal Oocytes Is Associated with Compromised Follicle Growth in Adult Rat Offspring. *Biol Reprod*. 2016;94(4):94.
115. Takumi K, Shimada K, Iijima N, Ozawa H. Maternal high-fat diet during lactation increases Kiss1 mRNA expression in the arcuate nucleus at weaning and advances puberty onset in female rats. *Neurosci Res*. 2015;100:21-8.
116. Terasawa E, Kurian JR, Keen KL, Shiel NA, Colman RJ, Capuano SV. Body weight impact on puberty: effects of high-calorie diet on puberty onset in female rhesus monkeys. *Endocrinology*. 2012;153(4):1696-705.
117. He Q, Karlberg J. Bmi in childhood and its association with height gain, timing of puberty, and final height. *Pediatr Res*. 2001;49(2):244-51.
118. Juul A, Magnusdottir S, Scheike T, Prytz S, Skakkebaek NE. Age at voice break in Danish boys: effects of pre-pubertal body mass index and secular trend. *Int J Androl*. 2007;30(6):537-42.
119. Wang Y, Dinse GE, Rogan WJ. Birth weight, early weight gain and pubertal maturation: a longitudinal study. *Pediatr Obes*. 2012;7(2):101-9.
120. Denzer C, Weibel A, Muehe R, Karges B, Sorgo W, Wabitsch M. Pubertal development in obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(10):1509-19.
121. Vandewalle S, Taes Y, Fiers T, Van Helvoirt M, Debode P, Herregods N, et al. Sex steroids in relation to sexual and skeletal maturation in obese male adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):2977-85.
122. Kleber M, Schwarz A, Reinehr T. Obesity in children and adolescents: relationship to growth, pubarche, menarche, and voice break. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2011;24(3-4):125-30.
123. Lee JM, Kaciroti N, Appugliese D, Corwyn RF, Bradley RH, Lumeng JC. Body mass index and timing of pubertal initiation in boys. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2010;164(2):139-44.

124. Adekunbi DA, Li XF, Li S, Adegoke OA, Iranloye BO, Morakinyo AO, et al. Role of amygdala kisspeptin in pubertal timing in female rats. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183596.
125. Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci*. 2008;28(46):12107-19.
126. Kim E, Chung MJ, Chung Y, Jun Y. The effect of diet control on puberty onset and immunoreactivity of kisspeptin and neurokinin B in female rats. *Endocr J*. 2018;65(12):1177-85.
127. Li XF, Lin YS, Kinsey-Jones JS, O'Byrne KT. High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats. *Endocrinology*. 2012;153(9):4422-31.
128. True C, Nasrin Alam S, Cox K, Chan YM, Seminara SB. Neurokinin B is critical for normal timing of sexual maturation but dispensable for adult reproductive function in female mice. *Endocrinology*. 2015;156(4):1386-97.
129. Dudek M, Kolodziejwski PA, Pruszynska-Oszmalek E, Sassek M, Ziarniak K, Nowak KW, et al. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats. *Neuropeptides*. 2016;56:41-9.
130. Ziarniak K, Yang T, Boycott C, Beetch M, Sassek M, Grzeda E, et al. DNA hypermethylation of Kiss1r promoter and reduction of hepatic Kiss1r in female rats with type 2 diabetes. *Epigenetics*. 2022;17(13):2332-46.
131. Borengasser SJ, Kang P, Faske J, Gomez-Acevedo H, Blackburn ML, Badger TM, et al. High fat diet and in utero exposure to maternal obesity disrupts circadian rhythm and leads to metabolic programming of liver in rat offspring. *PLoS One*. 2014;9(1):e84209.
132. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. 2002;298(5595):1039-43.
133. Suter MA, Chen A, Burdine MS, Choudhury M, Harris RA, Lane RH, et al. A maternal high-fat diet modulates fetal SIRT1 histone and protein deacetylase activity in nonhuman primates. *FASEB J*. 2012;26(12):5106-14.

134. Nicholas LM, Rattanaray L, Morrison JL, Kleemann DO, Walker SK, Zhang S, et al. Maternal obesity or weight loss around conception impacts hepatic fatty acid metabolism in the offspring. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(7):1685-93.
135. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*. 2009;9(4):327-38.

