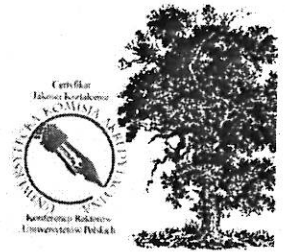




UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
ZAKŁAD EMBRIOLOGII

dr hab. Ewa Borsuk prof. ucz
e-mail: borsuk@biol.uw.edu.pl



Warszawa, 26 maja 2021

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
„Wpływ wybranych czynników genotoksycznych na oocyty myszy”
autorstwa Pana mgr. Łukasza Józefa Gąsiora
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Polańskiego

Problem niepłodności, definiowanej jako niemożność posiadania potomstwa przez normalnie współżyjącą parę, stał się w obecnych czasach tak poważny, że trafił na publikowaną przez WHO listę chorób cywilizacyjnych. Tempo życia, stres, zanieczyszczenie środowiska i wiele czynników, z których jeszcze nie zdajemy sobie sprawy, wpływa negatywnie na jakość gamet, a tym samym możliwość zajścia w ciążę i utrzymania jej. Wiadomo, że jakość gamet żeńskich, oocytów, obniża się wraz z wiekiem kobiety. Co gorsza, uważa się obecnie, że proces starzenia się oocytów w pęcherzykach jajnikowych jest wysoce zindywidualizowany oraz, że prawie 20% pacjentek leczących się z powodu niepłodności, wykazuje objawy przedwczesnego starzenia jajnikowego. W takich przypadkach zabiegi wspomaganego rozrodu często nie przynoszą pożądanego efektu. Utrzymanie wysokiej jakości oocytów przez cały okres rozrodczy osobnika jest w przypadku ssaków, do których się zaliczamy, niemałym wyzwaniem. Oogonia, komórki prekursorowe gamet żeńskich, rozpoczynają mejozę jeszcze w okresie życia płodowego osobnika, przekształcając się tym samym w oocyty I rzędu. Ich liczba już nigdy nie wzrośnie i będą trwały zatrzymane w profazie pierwszego podziału meiotycznego przez lata. W przypadku człowieka uważa się, że może to być nawet 50 lat. Sprawność mechanizmów kontrolujących podejmowanie zatrzymanego pierwszego podziału meiotycznego i prawidłowość jego ukończenia, jest kluczowa dla powstania przygotowanego do zapłodnienia oocytu II rzędu. Jeśli któryś z tych mechanizmów zawiedzie mogą powstać gamety aneuploidalne lub charakteryzujące się obniżonymi zdolnościami rozwojowymi. Zadaniem obu punktów kontrolnych jest wykrywanie nieprawidłowości/uszkożeń w genomie i wstrzymanie dalszego postępowania podziału do czasu ich naprawy, a w przypadku niepowodzenia naprawy, skierowanie komórki na drogę apoptozy. Istnieją przesłanki wskazujące, że równie istotną rolę jak uszkodzenia DNA jądrowego mogą mieć w tym procesie uszkodzenia genomu mitochondrialnego. Tylko sprawnie działające mitochondria są w stanie zapewnić taką ilość energii w postaci ATP, która pozwoli na utrzymanie dynamicznej struktury wrzeciona metafazy I i II podziału meiotycznego.

Kompleksowe badania podjęte przez mgr. Łukasza Gąsiora, który postawił sobie za cel ustalenie czy i w jakim stopniu uszkodzenia DNA jądrowego i mitochondrialnego są odpowiedzialne za aktywację punktów kontrolnych w dojrzewających oocytach, wpisują się doskonale w nurt prac poszukujących przyczyn obniżonej jakości oocytów. Choć badania, ze zrozumiałych względów, zostały przeprowadzone na modelu mysim, ich wyniki i konkluzje z nich płynące mogą być cenne przy analizie przyczyn niepłodności u ludzi.

Rozprawa doktorska mgr. Gąsiora poprzedzona jest *Wstępem*, wyczerpująco wprowadzającym w zagadnienia, którym poświęcona jest praca. Lektura tej części pracy pozwala czytelnikowi zapoznać się z oocytem pierwszorzędowym oraz procesem jego dojrzewania meiotycznego, a w szczególności działania punktów kontrolnych, co było obiektem badań przedstawionych w dalszej części pracy. Daje również przegląd

zgromadzonej wiedzy dotyczącej mitochondriów, ich genomu i aktywności w oocytach. W odpowiednich podrozdziałach Wstępu znajdujemy dobrze dobrane schematy i materiał fotograficzny odnoszący się do zjawisk opisanych w tekście. W rozdziale *Założenia i cele pracy* doktorant przedstawił swoje hipotezy badawcze i jasno sformułowane cele.

Aby móc zrealizować główny cel pracy mgr Gąsior użył dwóch związków genotoksycznych, etopozydu i t-BHP, o potencjalnie różnym stopniu oddziaływania na genom jądrowy i mitochondrialny. Szczegółowa analiza efektu działania obu związków na wiele aspektów procesu dojrzewania oocytów myszy stała się głównym zadaniem pierwszej części pracy. W pierwszej kolejności mgr Gąsior eksperymentalnie ustalił optymalne dla dalszych doświadczeń dawki etopozydu i t-BHP takie, które w podobny sposób zaburzały dojrzewanie oocytów w hodowli *in vitro*. I tu mam pierwsze pytanie. Etopozyd był rozcieńczany w DMSO w taki sposób, aby jak pisze na str. 48 autor, „nie przekraczał 0,5% objętości pożywki hodowlanej”. W znanych mi doświadczeniach zazwyczaj dokładano starań, aby to stężenie nie przekraczało 0,2%. Dodatkowo, grupa kontrolna oocytów/zarodków była zwykle hodowana w pożywce z takim samym dodatkiem DMSO. Czy takie próby zostały przeprowadzone, lub czy wiadomo z innych doświadczeń mgr. Gąsiora, że nie miało to wpływu na podejmowanie dojrzewania i żywotność oocytów. Co prawda, czas ekspozycji na etopozyd był krótki (20 minut), ale wiemy z doświadczenia, że nawet minuty bywają ważne, o czym zresztą świadczą wszystkie wyniki zawarte w pracy.

W tej części pracy autor przeanalizował wiele parametrów, na które mogły oddziaływać oba związki stresujące. Stosując specyficzne inhibitory punktów kontrolnych (profazowego G2/M i punktu kontrolnego wrzeciona SAC) wykazał, że to właśnie ich aktywność wstrzymuje dojrzewanie oocytów poddanych działaniu stresorów. Pokazał również, że oocyty są w stanie, przynajmniej do pewnego stopnia, naprawić uszkodzenia DNA. Wiadomo, że oocyty pierwszorzędowe izolowane z dużych pęcherzyków jajnikowych różnią się sposobem organizacji chromatyny i aktywnością transkrypcyjną. Te, o bardziej rozproszonej chromatynie syntetyzują RNA, podczas gdy oocyty, w jądrach których doszło do kondensacji chromatyny wokół jąderka, nie wykazują aktywności transkrypcyjnej. Oba typy oocytów mają też różne zdolności rozwojowe. Można więc przypuszczać, że oocyty o różnej aktywności mogą różnie reagować na podane związki. Rzeczywiście, w niniejszej pracy obserwowano wyraźnie większe uszkodzenia w oocytach nietranskrybujących, ale tylko po zastosowaniu etopozydu. Jednak zmieniając eksperymentalnie konfigurację chromatyny poprzez zahamowanie aktywności polimerazy RNA II, mgr Gąsior wykazał, że różnice w liczbie ognisk uszkodzeń DNA nie miały związku ani z aktywnością transkrypcyjną oocytów, ani z konfiguracją ich chromatyny.

Podsumowując tą część pracy doktorant wykazał w niej, że wybrane przez niego stresory nie wpływały negatywnie na żywotność oocytów w hodowli *in vitro*. Uszkodzenia wywołane przez każdy z nich prowadziły do aktywacji punktu kontrolnego wrzeciona, podczas gdy punkt kontrolny G2/M ulegał aktywacji jedynie w wyniku uszkodzeń wywołanych przez t-BHP.

Ponieważ zamysłem autora było sprawdzenie, czy uszkodzenia w genomie mitochondrialnym są istotnym elementem aktywacji punktów kontrolnych, znaczna część pracy jest poświęcona mitochondriom i ich reakcji na stosowane czynniki stresujące. Liczba mitochondriów i ich organizacja jest jednym z czynników, które są brane pod uwagę przy ocenie jakości oocytów. Dlatego też Pan mgr Gąsior przeanalizował organizację i morfologię tych struktur po zastosowaniu etopozydu i t-BHP. I tu pojawiły się bardzo interesujące obserwacje, bo tylko t-BHP powodował zmianę ułożenia mitochondriów w cytoplazmie badanych oocytów. Idąc tym tropem zbadano masę i potencjał błonowy mitochondriów, a także rolę reaktywnych form tlenu i produkcję ATP. Dodatkowo przeprowadzono ilościowe badanie mitochondrialnego DNA. Taka poszerzona analiza pozwoliła autorowi na stwierdzenie, że uszkodzenia DNA mitochondrialnego skutkują zwiększoną biogenezą mitochondriów, co może być sposobem na zrekompensowanie obniżonej jakości uszkodzonych mitochondriów. Jak wykazał mgr Gąsior ten mechanizm kompensujący działa

niezależnie od aktywności/obecności jądra oocytu i nie jest uzależniony od translacji zgromadzonych w cytoplazmie oocytu transkryptów.

Gromadzenie się mitochondriów w okolicy wrzeciona podziałowego jest niezbędne do jego prawidłowego uformowania i funkcjonowania. Analizując morfologię i rozmiar wrzecion podziałowych I i II metafazy mejotycznej doktorant wykazał poważne zaburzenia w ich organizacji, zwłaszcza w metafazie I i w przypadku uszkodzeń wywołanych t-BHP. W oocytach, które ukończyły I podział mejotyczny i osiągnęły metafazę II wrzeciona były znacznie lepiej zorganizowane, choć obserwowano nieprawidłowości ułożenia chromosomów. Interesującym mogłoby być sprawdzenie, czy liczba chromosomów w tych oocytach jest prawidłowa. Zgadzam się z panem Gąsior, który pisze, że SAC zatrzymuje w MI oocyty o najpoważniejszych nieprawidłowościach, pozwalając na przejście do kolejnego podziału tym najlepszym, jednak wydaje mi się, że warto by sprawdzić, czy w faktycznie jego działanie było w pełni skuteczne. W niektórych oocytach utrwalonych po 8 godzinach hodowli nie stwierdzono obecności wrzeciona, choć doszło do rozpadu pęcherzyka zarodkowego. Pisząc o tych przypadkach w *Dyskusji* mgr Gąsior użył stwierdzenia „całkowity jego zanik”, co sugerowałoby, że wrzeciono utworzyło się, a następnie doszło do całkowitej depolimeryzacji mikrotubul. Biorąc pod uwagę, że analizę przeprowadzono tylko w jednym punkcie czasowym (nie biorę tu pod uwagę drugiego utrwalenia po 18 godzinach hodowli) nie można nic powiedzieć na temat dynamiki procesu tworzenia wrzeciona i nie wiadomo czy w ogóle zaczęło ono powstawać.

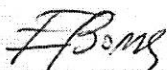
W moim odczuciu najbardziej spektakularną częścią pracy jest ta, w której dokonano transferu jąder (pęcherzyków zarodkowych) w różnych kombinacjach pomiędzy stresowanymi i niestresowanymi oocytami. Bardzo doceniam tą część z dwóch powodów. Po pierwsze, doświadczenie w sposób jasny pokazało który z genomów, jądrowy czy mitochondrialny, ulegają uszkodzeniu po zastosowaniu jednego lub drugiego stresora, co skutkowało różnymi reakcjami ze strony oocytu. Czyli pozwoliło oddzielić efekt uszkodzenia DNA jądrowego i mitochondrialnego. Dodatkowo poddanie cytoplasm działaniu t-BHP pięknie potwierdziło obserwowane wcześniej w całym oocytach zaburzenia organizacji mitochondriów. Po drugie, w pełni zdaję sobie sprawę ile wysiłku trzeba było włożyć w uzyskanie tych wyników. Myślę, że było warto, bo dzięki temu udało się wykazać, że uszkodzenia cytoplazmatyczne skutkują obniżoną efektywnością podejmowania dojrzewania mejotycznego, a więc zapewne aktywacji ulega punkt kontrolny G2/M, podczas gdy uszkodzenia DNA jądrowego są wystarczające, aby aktywować punkt kontrolny wrzeciona SAC.

Aby uzyskać wyniki wspomnianych powyżej eksperymentów pan Łukasz Gąsior wykorzystał cały szereg metod od relatywnie prostych technik cytologicznych, po bardziej wyrafinowane, jak wspomniana mikrochirurgia czy techniki biologii molekularnej. Wszystkie one zostały niezwykle skrupulatnie opisane w rozdziale *Materiały i metody*, który liczy 51 stron. Rozumiem chęć dokładnego przekazania, co i w jaki sposób zostało przeprowadzone, jednak w niektórych przypadkach opis jest niepotrzebnie bardzo rozbudowany. Przykładowo w podrozdziale poświęconym stosowanym inhibitorom opis każdego zajął ok. pół strony, choć niektóre z nich, np. α -amanityna, czy cyklohesymid są stosowane od bardzo dawna i nie wymagają tak szczegółowego opisu. Zamiast tego prosta tabelka, w której znalazłaby się informacja, na co działa inhibitor, w jakim stężeniu i w jakich stadiach był stosowany, znacznie ułatwiłaby odszukiwanie najważniejszych informacji. Podobnie opis analizy obrazów z mikroskopu konfokalnego jest niezwykle rozbudowany. Tu zresztą zainteresowało mnie, dlaczego do obrazowania wrzecion używano tak małego powiększenia (obiektyw x20), co odbiło się na jakości prezentowanych obrazów. Czy były jakieś głębsze do tego przesłanki?

Rozprawę zamyka wnikliwa i dobrze poprowadzona *Dyskusja*, w której autor poddał uzyskane przez siebie wyniki szczegółowej analizie, odwołując się do wcześniej publikowanych prac. Lektura tej części pracy pokazuje dobrą znajomość literatury tematu, w której pan Łukasz Gąsior swobodnie się porusza. Rozważania przez niego prowadzone wskazują na osiągnięcie odpowiedniego stopnia dojrzałości młodego naukowca.

Na koniec pozwolę sobie na łyżeczkę (nie łyżkę) dziegciu. Zapewne rozmiar dzieła spowodował, że Pan mgr Gąsior nie ustrzegł się przed niedociągnięciami redakcyjnymi. Praca ma wiele literówek. Niektóre w sposób istotny zmieniają treść zdania, co jest dość groźne i wymaga od leniwego czytelnika pewnego wysiłku umysłowego. Również niektóre konstrukcje stylistyczne budzą zdziwienie czytelnika. Znalazłam też błędy w opisach rycin. Na Ryc. 4.8.3 str. 122 i 123 mitochondria zwakuolizowane oznaczone na zdjęciach Mw, w opisie pod zdjęciem mają oznaczenie Mv. Podobnie ciała lipofuscynowe, oznaczone na zdjęciach CF, w legendzie występują jako CP. Nie zachwyca mnie też sposób organizacji niektórych, szczególnie dużych rycin. Np. rycina 4.6.3 zaczyna się na str. 112 i tu nie ma tytułu ani legendy, które pojawiają się dopiero na następnej stronie. To bardzo utrudnia oglądanie i czytanie opisu, zarówno w wersji elektronicznej jak i wydrukowanej. Tak zorganizowanych tablic ze zdjęciami jest więcej. Nie wiem, co powstrzymało autora przed podzieleniem ich na dwie mniejsze. Równie źle prezentują się te, których opis jest na następnej stronie np. Ryc. 4.8.2.. Nawet zakładając, że czytelnik nie sięgnie do wersji wydrukowanej i skupi się na elektronicznej, nie powinno się w ten sposób organizować tekstu.

Przedstawione powyżej uwagi nie wpłynęły na moją pozytywną ocenę i nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej Pana magistra Łukasza Gąsiora. Doktorant zrealizował wszystkie, postawione przed sobą cele. Otrzymane wyniki są oryginalne i poszerzają wiedzę na temat czynników wpływających na obniżenie jakości oocytów i dobrze wpisują się w ten nurt badań. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę i wnioskuję o dopuszczenie mgr. Łukasza Gąsiora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Ewa Borsuk prof. ucz.