

## STRESZCZENIE

---

Pozaustrojowe dojrzewanie oocytów (IVM) jest jedną z technik wspomaganego rozrodu (ART), do których, w dalszej kolejności zalicza się zapłodnienie in vitro (IVF) i hodowlę zarodków in vitro. W trakcie procedury IVM wykorzystuje się pozyskiwane od pacjentek niedojrzałe oocyty, które następnie hoduje się w odpowiednio dobranych pożywkach dojrzewających. Kluczowym warunkiem osiągnięcia sukcesu podczas stosowania ART, rozumianego jako uzyskanie prawidłowo rozwijającego się zarodka z zapłodnionego oocytu, jest otrzymanie najwyższej jakości oocytów z procedury IVM. Wysoką jakość oocytu warunkuje nabycie przez niego jednoczesnej dojrzałości cytoplazmatycznej (akumulacja potrzebnych mRNA, białek, reorganizacja rozmieszczenia organelli komórkowych) oraz dojrzałości jądrowej (wznowienie mejozy, pojawienie się ciała kierunkowego). Aby to osiągnąć, coraz częściej wykorzystuje się model hodowli przestrzennej/trójwymiarowej (3D), który zapewnia optymalne warunki do wzrostu i rozwoju, czy to oocytów czy też całych kompleksów oocyt-komórki wzgórka (COCs). Komórki wzgórka zapewniają oocytom m.in. dostęp do substratów energetycznych niezbędnych podczas dojrzewania, a także ochronę przed reaktywnymi formami tlenu. Nie jest zatem zaskakujące, że coraz więcej badań jest podejmowanych celem stworzenia optymalnego systemu IVM, który umożliwiłby zachowanie architektury przestrzennej COCs nawet podczas długotrwałej procedury dojrzewania pozaustrojowego. W prezentowanej pracy doktorskiej podjęto się opracowania metody hodowli 3D całych COCs świni izolowanych ze średnich pęcherzyków antralnych niedojrzałych płciowo zwierząt. Celem porównania, zaadaptowano i zmodyfikowano dwa modele hodowli 3D. W pierwszym z nich wykorzystano super-hydrofobowe mikrobioreaktory z fluorowanego etylenu i propylenu (FEP), określane jako Liquid Marbles (LM), w których COCs były zawieszane w kropli pożywki dojrzewającej otoczonej przez mikrocząstki FEP. W drugim modelu hodowli przestrzennej wykorzystano hydrożelowe kapsuły fibrynowo-alginianowe (FA).

Obecne w środowisku zanieczyszczenia przemysłowe, pestycydy i fungicydy, coraz częstsze stosowanie sterydów anabolicznych czy leków hormonalnej terapii zastępczej powoduje, że grupą związków, która wzbudza największe zainteresowanie badaczy są środowiskowe związki o aktywności endokrynej (EACs). EACs zakłócają funkcjonowanie gruczołów dokrewnych i gospodarkę hormonalną organizmów wywierając swój efekt biologiczny np. poprzez wiązanie się z receptorami endogennych hormonów. Nie bez znaczenia

jest również fakt wysokiej bioakumulacji tych związków w tkankach roślin i zwierząt, co w sposób pośredni, poprzez ich konsumpcję, może oddziaływać na organizmy ludzi obojga płci. W związku z tym, w niniejszej pracy doktorskiej podjęto się sprawdzenia, czy i w jaki sposób wybrane EACs: fungicyd – winklozolina (Vnz), steryd anaboliczny – nandrolon (Ndn), oraz immunosupresant - cyklosporyna A (CsA) wpływają na kompetencje rozwojowe oocytów świni oraz żywotność komórek wzgórka.

Aby ocenić, czy wybrane modele hodowli dojrzewającej (LM i FA) zapewniają optymalne warunki dla wzrostu i rozwoju oocytów wykonano pomiary ich średnicy w trakcie i po zakończeniu hodowli dojrzewającej, przeanalizowano ultrastrukturę COCs po zakończeniu procedury IVM, a także zastosowano barwienie immunofluorescencyjne celem oceny żywotności komórek wzgórka. Aby zbadać czy wybrane EACs indukują śmierć komórkową w dojrzewających *in vitro* COCs wykorzystano: metodę TUNEL w celu identyfikacji komórek apoptotycznych; mikromacierze białkowe w celu ilościowej analizy ekspresji białek zaangażowanych w regulację i przebieg procesu apoptozy. W celu określenia wpływu EACs na metabolizm energetyczny COCs wykonano w nich przyżyciowy pomiar oddychania mitochondrialnego w czasie rzeczywistym, przeprowadzono morfologiczną i ultrastrukturalną analizę kropli lipidowych, a także analizę ekspresji wybranych genów zaangażowanych w proces lipolizy. Dodatkowo przeprowadzono analizę ekspresji kluczowych genów, zaangażowanych w neutralizowanie reaktywnych form tlenu. Ostatnim zadaniem badawczym była ocena stopnia dojrzałości oocytów w oparciu o analizę ekspresji genów dla czynnika promującego dojrzewanie oraz analizę poziomu cAMP.

Podsumowując otrzymane wyniki można stwierdzić, że obydwa modele hodowli dojrzewającej 3D kompleksów oocyt-komórki wzgórka świni zapewniają optymalne warunki do wzrostu oocytów. Utrzymują również organizację przestrzenną COCs poprzez zapobieganie ich spłaszczaniu, a w konsekwencji rozrywaniu połączeń szczelinowych. Dzięki temu zostaje zachowana funkcjonalna relacja między oocytem, a otaczającymi go komórkami wzgórka. Zatem obydwa modele mogą być cennym narzędziem do badań podstawowych w biologii rozrodu. Mogą mieć także znaczenie kliniczne, prowadząc do poprawy leczenia niepłodności. W związku z obecnością ciałek kierunkowych w oocytach poddanych procedurze IVM z wykorzystaniem kapsuł FA należy stwierdzić, że model ten w pełni umożliwia synchronizację dojrzewania jądrowego i cytoplazmatycznego co jest kluczowe dla osiągnięcia pełnego potencjału rozwojowego oocytów. Dlatego też tylko hydrożelowe kapsuły FA zostały wykorzystane w kolejnym etapie badań, w którym analizowano wpływ Vnz, Ndn oraz CsA na metabolizm COCs.

Przeprowadzona analiza śmierci komórkowej wykazała, że każdy z zastosowanych EACs powoduje śmierć komórek wzgórka, chociaż jest ona regulowana przez inne szlaki. I tak, Vnz aktywuje szlak p53 - FOXO3 – kaspaza 3, Ndn aktywuje szlak TNF- $\beta$  – kaspaza 3, a CsA: cytochrom c – kaspaza 3. Dodatkowo, CsA indukuje proces autofagii o czym świadczy zwiększony poziom mRNA dla LC3 i obecność licznych autofagosomów w cytoplazmie oocytów. Co ciekawe, w COCs hodowanych w obecności Ndn zaobserwowano zwiększoną ekspresję białek związanych z transformacją nowotworową (HSP27 i TNF- $\beta$ ). Analiza aktywności mitochondrialnej pokazała, że Ndn i CsA obniżają syntezę ATP, natomiast COCs hodowane z dodatkiem Vnz wykazywały zwiększoną produkcję ATP. Co więcej, również w tej grupie zaobserwowano zwiększony poziom ROS. Wyniki otrzymane z analizy stopnia dojrzałości cytoplazmatycznej i jądrowej pokazały, że Ndn hamuje proces dojrzewania cytoplazmatycznego o czym świadczy akumulacja kropli lipidowych oraz zwiększony poziom mRNA dla perylipiny 2 (markera kropli lipidowych), a także jądrowego – tu obserwowano wzrost akumulacji cAMP. Z kolei Vnz przyspiesza dojrzewanie oocytu czego dowodzi podwyższony poziom mRNA dla cykliny B.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że wszystkie trzy stosowane związki mają negatywny wpływ na jakość dojrzewających oocytów, ponieważ aktywują procesy śmierci komórkowej w komórkach wzgórka. Co więcej, zarówno Vnz jak Ndn zakłócają prawidłowy przebieg dojrzewania jądrowego oocytów: Vnz powoduje ich przedwczesne dojrzewanie, podczas gdy Ndn proces dojrzewania oocytów hamuje. Choć nie wykazano jednoznacznie negatywnego wpływu CsA na proces dojrzewania oocytów, to w oparciu o otrzymane wyniki można stwierdzić, że jej długie stosowanie może zaburzać metabolizm oocytów, w konsekwencji powodując obniżenie ich jakości. W świetle przeprowadzonych badań, coraz częstsze problemy z zajściem i utrzymaniem ciąży, niskie wskaźniki sukcesu w procedurach IVM oraz IVF, mogą wynikać z nadmiernego stosowania pestycydów w rolnictwie, niekontrolowanego zażywania sterydów anabolicznych, a także mogą być niejako skutkiem ubocznym terapii różnymi farmaceutykami.

Gorczyca  
Julia Duda