

## STRESZCZENIE

Przeważająca większość aneuploidii płodowych u ssaków powodowana jest błędną segregacją chromosomów podczas mejozy żeńskiej, która może nastąpić w wyniku upośledzenia funkcji punktu kontrolnego wrzeciona (SAC), mechanizmu blokującego anafazę w przypadku wystąpienia anomalii wrzeciona. Oocyty ssaków są szczególnie podatne na błędy segregacji chromosomów, co zrodziło sugestię, że w dużych komórkach takich jak oocyty sygnał generowany przez SAC może ulegać znacznemu „rozcieńczeniu” w dużej objętości cytoplazmy, powodując obniżenie efektywności działania tego mechanizmu. W niniejszej pracy zbadano wpływ zmian objętości cytoplazmy na efektywność działania punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego w oocytach mysich. W tym celu stworzono model badania regulacji efektywności SAC, w którym zmniejszano lub zwiększano objętość oocytu poprzez usunięcie lub dodanie ilości cytoplazmy odpowiadającej połowie normalnej objętości oocytu, a następnie takie oocyty hodowano w progowej dawce nokodazolu, farmaceutyku uszkadzającego wrzeciono. Wykazano, że eksperymentalne zmniejszenie objętości cytoplazmy w oocytach profazowych w znaczącym stopniu wpływa na zwiększenie skuteczności działania SAC, ponieważ odsetek oocytów, które nie uległy zablokowaniu w metafazie I za pośrednictwem SAC i przeszły pierwszy podział mejotyczny wyraźnie się obniżył w porównaniu z oocytami normalnej wielkości (odpowiednio 4% i 36%). Wyniki te zyskały potwierdzenie w kolejnych doświadczeniach, w których w obecności progowej dawki nokodazolu odsetek oocytów przechodzących przez pierwszy podział mejotyczny wzrósł z 20% w oocytach o normalnej wielkości do 54% w oocytach o powiększonej objętości cytoplazmy, co wyraźnie wskazuje, że zwiększenie objętości oocytu w znaczący sposób wpływa na osłabienie efektywności działania SAC. W przeciwieństwie do oocytów profazowych, redukcja cytoplazmy w oocytach, które weszły w fazę M nie wpływa na wzmocnienie skuteczności działania SAC, co sugeruje, że w regulację jego aktywności mogą być zaangażowane niektóre czynniki zlokalizowane w jądrze profazowym, które po rozpadzie otoczki jądrowej ulegają rozproszeniu w cytoplazmie.

Znaczący odsetek oocytów myszy ze szczepu LT/Sv zostaje przedwcześnie zablokowany w stadium metafazy pierwszego podziału mejotycznego (metafaza I), czego przyczyną jest przedłużona aktywność SAC. Stąd oocyty tego szczepu myszy stanowią doskonały model badawczy, który może przyczynić się do poznania mechanizmów działania SAC w przebiegu mejozy żeńskiej. W niniejszej pracy podjęto próbę ustalenia przyczyn dla

  
Kukulski

których SAC w oocytach LT/Sv nie podlega terminowemu wyłączeniu. Ponieważ aktywacja SAC najczęściej związana jest z anomalią wrzeciona podziałowego, w pierwszej kolejności wykonano analizy morfometryczne wrzeciona podziałowego, które nie wykazały występowania widocznych defektów w budowie wrzeciona, manifestujących się zmianami rozmiarów wrzeciona czy też jego morfologii. Analiza statusu chromatyny oraz wielkości oocytów LT/Sv wykluczyła przypuszczenie, że zaburzony przebieg mejozy w oocytach LT/Sv powodowany jest obniżonymi kompetencjami meiotycznymi.

Wiadomo, że oocyty LT/Sv zablokowane w MI przy doświadczalnie wyłączonym CSF stopniowo wychodzą z bloku metafazowego począwszy od około 17 godziny od rozpoczęcia dojrzewania. Założyłam, że jedną z możliwych przyczyn tego zjawiska mogłoby być występowanie opisywanego w komórkach mitotycznych zjawiska „checkpoint slippage” polegającego na stopniowym osłabianiu SAC w warunkach wymuszających jego długą aktywność. Dla zbadania tego zagadnienia opracowałam model powielający fenotyp LT/Sv w oocytach myszy linii outbred. W modelu tym oocyty myszy outbred hodowano w dawce nokodazolu powodującej zablokowanie dojrzewania meiotycznego w metafazie I u około 60% oocytów, podobnie jak w szczepie LT/Sv. W oocytach outbred hodowanych w tych warunkach farmakologiczne wyłączenie CSF powodowało stopniowe wychodzenie z bloku metafazowego. Wyniki te pozwoliły po raz pierwszy wykazać, że „checkpoint slippage”, zjawisko opisywane jak dotąd tylko w komórkach mitotycznych, zachodzi prawdopodobnie także podczas mejozy oocytów.

Analiza dynamiki wyrzucania pierwszego ciała kierunkowego wykazała, że oocyty starszych samic LT/Sv kończą pierwszy podział meiotyczny znacznie wcześniej niż oocyty młodszych samic. Tendencję do wcześniejszego wyrzucania ciała kierunkowego w oocytach starszych samic zaobserwowałam także u myszy typu dzikiego. Dane te sugerują, że u myszy wraz z wiekiem dochodzi do stopniowego osłabiania efektywności punktu kontrolnego wrzeciona.

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki stanowią mocne wsparcie dla poglądu, że osłabienie efektywności działania SAC w oocytach ssaków jest istotnym czynnikiem wysokiego ryzyka aneuploidii płodowych.