

# 1. Streszczenie

Apoptoza to fizjologiczna, samobójcza śmierć komórki. Jest ona zaprogramowana genetycznie („wewnątrzkomórkowy program śmierci”). Wymaga nakładu energetycznego komórki i jest aktywnie regulowana przez indukcję odpowiednich genów, kodujących specyficzne białka. Apoptoza jest konserwatywnym, wieloetapowym procesem, regulowanym zarówno przez czynniki wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowe. W procesie apoptozy dochodzi do kondensacji chromatyny i jej agregacji przy błonie jądrowej, obkurczania cytoplazmy oraz do fragmentacji jądra. Procesy te najczęściej są poprzedzone rozkładem DNA na odcinki odpowiadające długości nukleosomu (ok. 180-200 pz). Kończącym etapem apoptozy jest fragmentacja cytoplazmy i rozdział nienaruszonych organelli komórkowych do struktur zwanych ciałkami apoptotycznymi. Zakłada się, że każda komórka posiada potencjalną zdolność do wejścia na ścieżkę apoptozy. O tym, czy tak się stanie, decyduje wewnątrzkomórkowa proporcja między czynnikami pro- (Bax, Bad, Bcl Xs, Bak) i antyapoptotycznymi (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w, Mcl-1). Pobudzone są one na drodze receptorowej i mitochondrialnej. Czynniki te następnie aktywują enzymy efektorowe (kaspazy, nukleazy), co skutkuje degeneracją komórki.

Apoptoza jest procesem występującym zarówno w zdrowym organizmie, gdzie pozwala na utrzymanie homeostazy między komórkami proliferującymi a umierającymi, jak i w stanach patologicznych, zapewniając sprawne usuwanie zmienionych chorobowo komórek. Apoptoza jest zjawiskiem powszechnie występującym również w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych różnych gatunków ssaków. W mysich owulowanych oocytach zaobserwowano programowaną śmierć komórki dopiero po ich długotrwałej hodowli. Natomiast w zarodku przez pierwsze sześć cykli podziałów komórkowych nie jest ona obserwowana. Zjawisko apoptozy pojawia się dopiero w trakcie formowania blastocysty. Można przypuszczać, że brak apoptozy w najwcześniejszych etapach rozwoju przedimplantacyjnego służy ochronie (nielicznych na tym etapie rozwoju) komórek zarodka.

Jak dotąd nie prowadzono badań wyjaśniających, dlaczego apoptoza nie występuje w najwcześniejszych etapach rozwoju przedimplantacyjnego ssaków. Celem niniejszego doktoratu jest poznanie mechanizmów kontroli apoptozy w oocytach i poszczególnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego zarodka myszy.

Prowadzone badania składały się z dwóch etapów. W **części I** określony został wpływ zmiany organizacji struktury zarodka (np. agregacja 2 zarodków 2-komórkowych, biopsja jednego blastomeru z zarodka 2-komórkowego) na apoptozę, w **części II** określony został profil ekspresji wybranych genów związanych z apoptozą w odpowiedzi na 24 godz. inkubację z czynnikami proapoptotycznymi (staurosporyna lub TNF $\alpha$ ) w różnych stadiach rozwoju zarodka przedimplantacyjnego myszy.

W wynikach **części I** wykazano, że przeprowadzone manipulacje mają wpływ zarówno na częstotliwość, jak i na liczbę apoptoz w przedimplantacyjnym zarodku myszy. W żadnej z grup doświadczalnych, podobnie jak i w grupie kontrolnej, nie zaobserwowano apoptozy przed zajściem procesu kawitacji. Wielu autorów również donosi, że apoptoza u myszy zachodzi naturalnie dopiero na etapie blastocysty. Co ciekawe, największy odsetek wczesnych jak i późnych blastocyst z co najmniej 1 apoptotyczną komórką występował w grupie kontrolnej, co sugeruje, że zjawisko to może być niezbędne do dalszego prawidłowego rozwoju zarodka. Może ona być zależna od czasu od zapłodnienia lub uformowania blastocysty *per se*.

Zaobserwowałem korelację pomiędzy stadium rozwoju zarodka, a prawdopodobieństwem wystąpienia apoptozy (apoptoza występowała od stadium blastocysty), w jakim znajdował się zarodek oraz linia komórkowa (trofektoderma – TE lub węzeł zarodkowy – ICM). Mniejszy wpływ miały procedury doświadczalne, które obniżały liczbę oraz częstość występowania komórek apoptotycznych w porównaniu do kontroli.

Wszystkie przeprowadzone przeze mnie procedury manipulacyjne miały wpływ zarówno na całkowitą liczbę komórek (jak i szczególnie w TE i ICM) oraz stosunek ICM:TE.

W wynikach **części II** wykazałem, że oocyty ulegają apoptozie pod wpływem czynników proapoptotycznych. W zarodkach przedimplantacyjnych zjawisko programowanej śmierci komórki zaobserwowano dopiero na etapie blastocysty. Musi więc istnieć mechanizm chroniący komórki wczesnego zarodka przedimplantacyjnego myszy. W niniejszej pracy zaproponowałem 2 mechanizmy mogące regulować apoptozę w pierwszych dniach rozwoju nowego osobnika. W obu przypadkach kluczowym genem jest sirtuina 1 (*SIRT1*).

Ekspresja genów proapoptotycznych (*Bax*, *Casp3*, *p53*) w czasie rozwoju przedimplantacyjnego nie była najwyższa w tych grupach w których obserwowana była apoptoza. Natomiast jeśli chodzi o wpływ czynnika apoptotycznego w danym stadium wszędzie obserwowana była tendencja do wzrostu ich ekspresji. Jest to wynik bardzo interesujący. Możliwe jest iż mimo wysokiej ekspresji tych genów we wczesnym zarodku

przedimplantacyjnym apoptozę blokuje wysoki poziom *SIRT1*. Dopiero gdy ekspresja *SIRT1* osiągnie odpowiednio niski poziom program śmierci komórkowej może zostać aktywowany.

Wszystkie moje badania skupiały się jedynie na ekspresji genów na poziomie transkryptu. Aby potwierdzić kluczową rolę *SIRT1* w regulacji apoptozy w przedimplantacyjnym rozwoju myszy wymagane są dalsze badania określające poziom kodowanych przez te geny białek, interakcje między nimi oraz badania funkcjonalne.