

# **AUTOREFERAT**

**dr Monika Hułas-Stasiak**

**Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie**

**Lublin 2019**

**I. Imię i nazwisko****dr Monika Hułas-Stasiak**

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

monika.hulas-stasiak@poczta.umcs.lublin.pl

tel.+48 81 537-59-08, fax +48 81 537-59-01

**II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2000</b> | <b>Magister biologii</b><br>Praca magisterska pt.: "Wpływ kwercetyny na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych jelita grubego człowieka " Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, promotor pracy magisterskiej prof. dr hab. Antoni Gawron.                                                                                                                                                  |
| <b>2007</b> | <b>Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii</b><br>Rozprawa doktorska pt.: "Budowa i funkcjonowanie gonady żeńskiej <i>Acomys cahirinus</i> (Desmarest, 1819) w okresie postnatalnym." Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, promotor prof. dr hab. Antoni Gawron, recenzenci: prof. dr hab. Maria Szołtys (Uniwersytet Jagielloński), prof. dr hab. Regina Cybulska (Akademia Rolnicza w Lublinie). |

**III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

|                                       |                                                                                                                                    |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>01.10.2000 - 30.09.2008</b>        | Asystent w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej |
| <b>01.10.2008 - do chwili obecnej</b> | Adiunkt w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej.  |

**IV. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):****A) Tytuł osiągnięcia:**

**Folikulogeneza w warunkach fizjologicznych i indukowanych  
w wybranych modelach ssaków**

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 5 prac oryginalnych opublikowanych w latach 2011–2019.

**B) Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:**

1. **Hulaś-Stasiak M.,** Gawron A. (2011) Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary. *Apoptosis* 16:967-975.  
**IF<sub>2011</sub>: 4,788; IF<sub>2018</sub>: 3,967; punkty MNiSW: 30, autor korespondencyjny**
2. **Hulaś-Stasiak M.,** Dobrowolski P., Tomaszewska E., Kostro K. (2013) Maternal acrylamide treatment reduces ovarian follicle number in newborn guinea pig offspring. *Reproductive Toxicology* 42:125-131.  
**IF<sub>2013</sub>: 2,771; IF<sub>2018</sub>: 2,580; punkty MNiSW: 35, autor korespondencyjny**
3. **Hulaś-Stasiak M.,** Dobrowolski P., Tomaszewska E. (2016) Prenatally administered dexamethasone impairs folliculogenesis in the spiny mouse offspring. *Reproduction, Fertility and Development* 28:1038-1048.  
**IF<sub>2016</sub>: 2,656; IF<sub>2018</sub>: 2,105; punkty MNiSW: 30, autor korespondencyjny**
4. **Hulaś-Stasiak M.,** Dobrowolski P., Pawlikowska-Pawlęga B., Tomaszewska E., Muszyński S. (2017) The effects of dexamethasone administered during pregnancy on the postpartum spiny mouse ovary. *PLoS ONE* 12(8): e0183528 doi: 10.1371/journal.pone.0183528; ISSN: 1932-6203  
**IF<sub>2017</sub>: 2,806; IF<sub>2018</sub>: 2,766; punkty MNiSW: 40, autor korespondencyjny**
5. **Hulaś-Stasiak M.,** Jakubowicz-Gil J., Dobrowolski P., Tomaszewska E., Muszyński S. (2019) Maternal  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) supplementation during pregnancy affects early folliculogenesis in the ovary of newborn piglets. *Theriogenology* 128:91-100  
**IF<sub>2018</sub>: 2,136; punkty MNiSW: 35, autor korespondencyjny**

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) w.w. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania:

**15,157**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW: 170

**C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Prace eksperymentalne realizowane w ramach przedłożonego osiągnięcia naukowego obejmowały dwa komplementarne nurty badawcze. Analizę mechanizmów leżących u podstaw atrezji pęcherzyków jajnikowych oraz wpływ wybranych związków podawanych prenatalnie lub postnatalnie na strukturę i funkcjonowanie jajnika (szczególnie w okresie neonatalnym). Wyniki przeprowadzonych badań wraz z uzasadnieniem wyboru danej substancji i zwierzęcego modelu badawczego zostały zaprezentowane w dalszej części autoreferatu.

**Celem badań przedstawionych w osiągnięciu naukowym było:**

- poznanie mechanizmów prowadzących do atrezji pęcherzyków jajnikowych,
- określenie skutków prenatalnej i/lub postnatalnej ekspozycji jajnika na wybrane związki w kontekście ich wpływu na folikulogenezę, atrezję pęcherzyków i proces luteolizy.

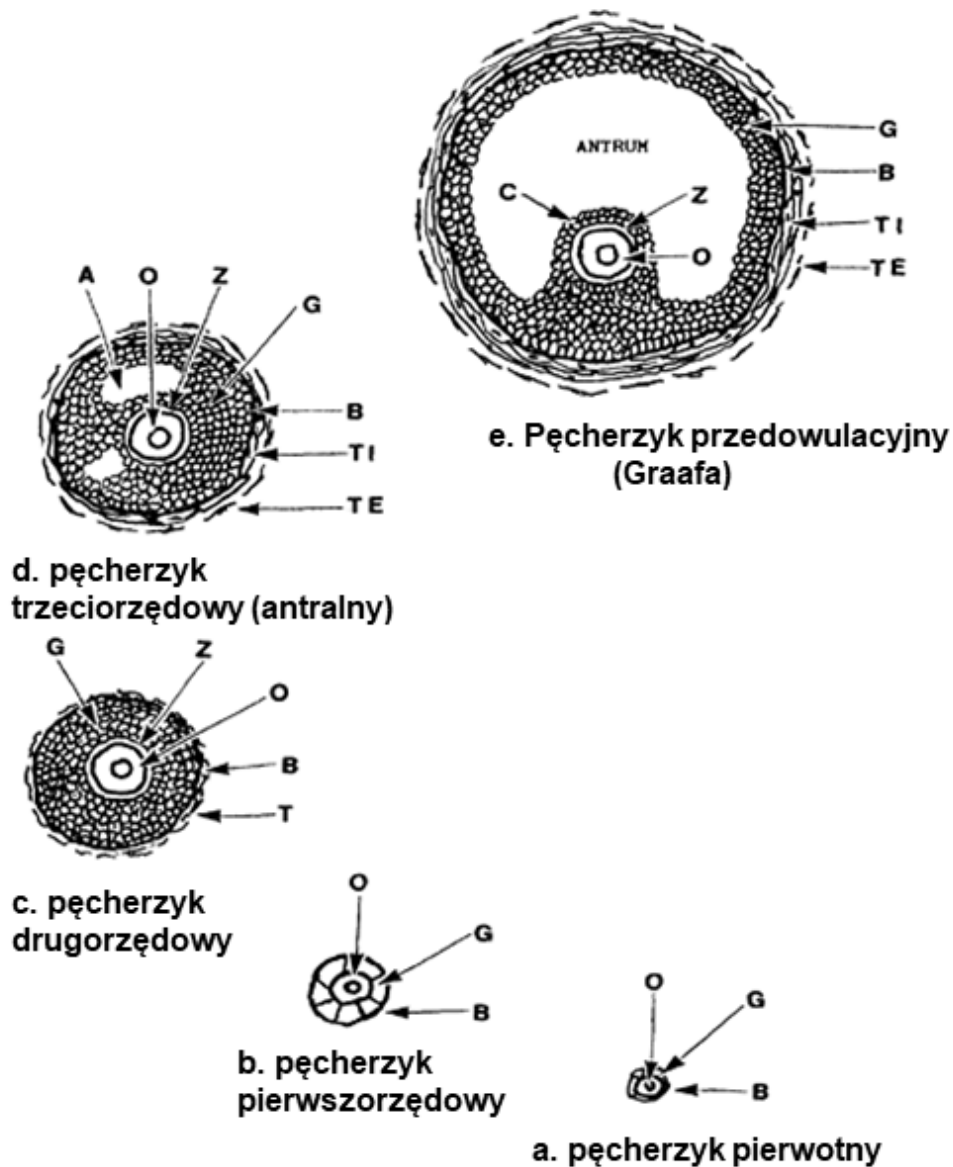
**Prace badawcze, które doprowadziły do realizacji tego celu obejmowały:**

- ocenę struktury morfologicznej jajnika badanych zwierząt,
- identyfikację apoptozy i autofagii jako podstawowych procesów zaangażowanych w atrezję pęcherzyków jajnikowych i proces luteolizy,
- określenie ekspresji białek biorących udział w procesie apoptozy i autofagii.

**Wprowadzenie**

Gonada żeńska odgrywa istotną rolę w reprodukcji poprzez wytwarzanie gotowych do zapłodnienia komórek rozrodczych (oocytów) oraz wydzielanie hormonów płciowych (estrogenów, progesteronu). Funkcjonalną jednostkę jajnika ssaków stanowi pęcherzyk jajnikowy składający się z oocyta, somatycznych komórek ziarnistych i komórek osłonki. Pęcherzyk jajnikowy jest niezwykle dynamiczną strukturą, zmieniającą się w czasie rozwoju zarówno morfologicznie jak i czynnościowo, a jego funkcją jest stworzenie odpowiedniego mikrośrodowiska dla wzrostu i dojrzewania oocyta. W zależności od fazy rozwojowej wyróżnia się następujące formy pęcherzyków jajnikowych (Fig.1):

- pęcherzyki pierwotne
- pęcherzyki pierwszorzędowe (I-rzędowe)
- pęcherzyki drugorzędowe (II-rzędowe)
- pęcherzyki antralne (III-rzędowe)
- pęcherzyki przedowulacyjne (dojrzałe, Graafa)



**Fig. 1 Stadia rozwoju pęcherzyka (a-e).**

A – jamka pęcherzyka;  
C – wzgórek jajonośny;  
O – oocyt;  
Z – osłonka przejrzysta

B – błona podstawna;  
G – komórki ziarniste;  
TE – komórki osłonki zewnętrznej;  
TI – komórki osłonki wewnętrznej

## Folikulogeneza

Folikulogeneza czyli proces rozwoju i wzrostu pęcherzyków jajnikowych u niektórych gatunków ssaków, w tym u człowieka, rozpoczyna się jeszcze w okresie życia prenatalnego, a następnie jest kontynuowany w okresie postnatalnym. U innych ssaków np. gryzoni, pierwsze pęcherzyki pojawiają się w okresie pourodzeniowym (neonatalnym). Czas tworzenia się pęcherzyków jest więc cechą gatunkową, uwarunkowaną rozpoczęciem mejozy w oogoniach, a tym samym przekształceniem ich w oocyty. Oocyty są centrami do których przywędrowują i wokół których rozwijają się somatyczne elementy pęcherzyka. Początkowo pęcherzyk jest otoczony pojedynczą warstwą spłaszczonych komórek ziarnistych, na zewnątrz której tworzy się błona podstawna [Bielańska-Osuchowska 1994]. Tak ukształtowany pęcherzyk nosi nazwę pęcherzyka pierwotnego (Fig.1a). Znaczna ilość oocytów nie zostaje jednak wcielona do pęcherzyków i te które nie stają się ich częścią składową ulegają degeneracji (np. u świni domowej stanowią one 60% w stosunku do liczby oocytów w momencie narodzin, Guthrie i Garrett, 2001). Kolejne stadia pęcherzykowego rozwoju tj. pęcherzyki pierwszorzędowe i drugorzędowe cechuje wzrost objętości i ilości komórek ziarnistych, wzrost oocytu i formowanie osłonki pęcherzyka (Fig.1b,c). Pęcherzyki antralne (trzeciorzędowe) powstają w trakcie rozwoju postnatalnego. Są większe od poprzednich, a w warstwie ziarnistej pojawiają się liczne jamki (*lac. antrum* - jamka) wypełnione płynem (Fig. 1d). Wzrost i dojrzewanie tego typu pęcherzyków jest zależny od działania gonadotropin, podczas gdy wcześniejsze etapy rozwoju nie wymagają ich obecności [Bielańska-Osuchowska, 1994]. W osłonce pęcherzykowej można wyróżnić warstwę zewnętrzną (*theca externa*) zbudowaną głównie z fibroblastów, włókien kolagenowych oraz miocytów gładkich. Natomiast warstwę wewnętrzną (*theca interna*) stanowią komórki steroidogenne produkujące androgeny. W miarę dojrzewania pęcherzyka antralnego jamki zajmują coraz większą przestrzeń, aż w końcu łączą się w jedną, centralnie położoną jamkę. Warstwa ziarnista ulega różnicowaniu [Szołtys, 1999]. Komórki ziarniste wsparte na błonie podstawnej przybierają kolumnowaty kształt, wynikiem czego jest tzw. pseudostratyfikacja tej strefy zwanej warstwą muralną. Komórki muralne są bardziej wyspecjalizowane od przylegających do jamki komórek ziarnistych (antralnych), przejawem czego jest większa liczba receptorów LH i enzymów zaangażowanych w steroidogenezę. Oocyt wraz z komórkami wieńca promienistego znajduje się zwykle blisko ściany pęcherzyka, w grupie komórek ziarnistych, tworzącej wzgórek jajonośny (*lac. cumulus oophorus*). Tak wykształcony pęcherzyk nosi nazwę pęcherzyka przedowulacyjnego (Fig. 1e). Warunkiem osiągnięcia przez pęcherzyk dojrzałości owulacyjnej jest wykształcenie odpowiedniej ilości receptorów dla FSH. Ich obecność zapewnia aktywację aromataz, dzięki czemu zwiększa się

sekrecja estradiolu, a w komórkach ziarnistych wzrasta ilość receptorów dla LH [Bielańska-Osuchowska, 1994]. Dopiero w tak przygotowanym pęcherzyku zachodzą zmiany prowadzące do owulacji.

### **Atrezja**

Utworzona w okresie życia płodowego lub neonatalnego pula pęcherzyków pierwotnych stanowi tzw. rezerwę jajnikową, reprezentującą całkowitą ilość komórek rozrodczych w życiu samicy. Z puli tej nieustannie zaczynają wzrastać kolejne pęcherzyki, aż do wygaśnięcia funkcji jajnika. Jednakże większość pęcherzyków jajnikowych ulega degeneracji w procesie zwanym atrezią. W zależności od gatunku, ilość degenerujących pęcherzyków waha się od 70 do 99% [Cran i Moor, 1980; Hsueh i wsp., 1994]. Atrezja dotyczy pęcherzyków znajdujących się we wszystkich stadiach rozwojowych.

Morfologiczne oznaki atrezji widoczne są przede wszystkim w oocytach i komórkach ziarnistych. W oocytach, które ulegają degeneracji obserwuje się pofałdowaną osłonkę jądrową, silnie zwakuolizowaną cytoplazmę a w końcowej fazie tego procesu ich fragmentację i lizę [Devine i wsp., 2000]. W pęcherzykach atretycznych komórki warstwy ziarnistej są mniej liczne, na skutek zahamowania ich podziałów mitotycznych. Często pierwszym objawem rozpoczynającej się degeneracji jest pyknoza jąder komórkowych oraz zanikanie złącz szczelinowych pomiędzy komórkami ziarnistymi, jak również „odklejanie się” komórek od błony podstawnej. W późniejszych stadiach atrezji komórki są fagocytowane lub ulegają lizie. Komórki osłonki wewnętrznej ulegają znacznemu przerostowi, przekształcając się we wtórne komórki interstycjalne produkujące steroidy [Hsueh i wsp., 1994]. Atrezji sprzyjają również zaburzenia w mikrokrażeniu osłonki pęcherzyka, redukujące dostarczanie tlenu i substancji odżywczych do warstwy ziarnistej. Oprócz wyżej opisanych zmian morfologicznych, zachodzących w degenerujących pęcherzykach, obserwuje się również szereg biochemicznych markerów atrezji min. obniżoną syntezę estrogenów, wzrost produkcji androgenów i progesteronu, obniżoną ekspresję mRNA dla aromatazy i receptorów dla gonadotropin, zahamowanie ekspresji koneksyny 43 [Hsueh i wsp., 1994].

### **Mechanizmy atrezji jajnikowej**

U podstaw atrezji leży apoptoza czyli genetycznie kierowany proces zaprogramowanego obumierania komórek (I typ śmierci komórkowej) [Hsueh i wsp., 1994]. Komórki umierające w wyniku apoptozy wykazują charakterystyczne cechy morfologiczne. Komórka apoptotyczna z reguły oddziela się od pozostałych, dochodzi do jej obkurczenia i zmiany kształtu. Następuje kondensacja chromatyny, fragmentacja jądra komórkowego i tworzenie ciałek apoptotycznych. Apoptoza jest procesem wieloetapowym, ściśle

skoordynowanym i precyzyjnie regulowanym przez liczne białka. Na poziomie molekularnym apoptoza może być inicjowana poprzez dwa szlaki: zewnętrzny i wewnętrzny. Pierwszy z nich, zewnętrzny (receptorowy) wiąże się z pobudzeniem błonowych receptorów śmierci, które należą do nadrodziny receptorów TNF (*ang. tumor- necrosis factor*, czyli czynnika martwicy nowotworu). Kiedy dojdzie do połączenia się liganda z receptorem śmierci następuje jego oligomeryzacja oraz powstanie kompleksu DISC (*ang. death- inducing signaling complex*). To prowadzi do aktywacji proteolitycznych enzymów, w tym efektorowej kaspazy 3, która niszczy białka strukturalne oraz enzymatyczne, co w konsekwencji prowadzi do całkowitej dezintegracji komórki w końcowej fazie tego procesu. Z kolei szlak wewnętrzny (mitochondrialny) uzależniony jest od uwolnienia cytochromu c z przestrzeni międzylonowej mitochondrium. Umożliwiają to wyspecjalizowane kanały utworzone przez białka z rodziny Bcl-2, w skład której wchodzi zarówno białko proapoptotyczne Bax (*ang. Bcl-2 associated X protein*) jak i antyapoptotyczne Bcl-2 (*ang. B-cell lymphoma 2*). Po uwolnieniu cytochromu c, na terenie cytoplazmy powstaje kompleks zwany apoptosomem, który jest niezbędny do oligomeryzacji i autoproteolizy kaspazy 9 - bezpośredniego aktywatora efektorowej kaspazy 3. Jak wykazały ostatnie badania apoptoza nie jest jedynym procesem zaangażowanym w atreję pęcherzyków jajnikowych. Komórki mogą ulegać degeneracji również na drodze autofagii, która jest określana jako II typ programowanej śmierci komórkowej [Klinosky i Emr 2000; Swanson, 2006].

Autofagia, nazywana również samostrawieniem lub samozjadaniem, zachodzi we wszystkich komórkach eukariotycznych zarówno w warunkach prawidłowych jak i patologicznych. W wielu przypadkach autofagia może stanowić strategię przeżycia komórki w warunkach stresowych takich jak: głodzenie, niedotlenienie czy stosowanie chemioterapeutyków. Proces autofagii, w odróżnieniu od apoptozy, nie wymaga obecności kaspaz. Autofagia charakteryzuje się niewielką kondensacją chromatyny oraz brakiem fragmentacji jądra. W tym procesie degradowane są uszkodzone lub нефункционалне białka o długim okresie półtrwania oraz organelle komórkowe takie jak, aparat Golgiego, retikulum endoplazmatyczne oraz polirybosomy, które są już zbędne w komórce. Resztki nie są usuwane do środowiska zewnętrznego, lecz zamykane w wakuoli o podwójnej błonie, tak zwanym autofagosomie, dzięki czemu autofagii nie towarzyszy stan zapalny. Znaczącą rolę w tym procesie odgrywa Bclina 1, która oddziałując z innymi białkami inicjuje utworzenie autofagosomu [Kang i wsp., 2011]. Podczas dojrzewania autofagosomu następuje jego fuzja z lizosomem, w skutek czego powstaje autofagolizosom. Białka Lamp1 związane z błoną lizosomów odgrywają ważną rolę w tym procesie, a ich amplifikacja w komórce świadczy o indukcji autofagii [Eskelien, 2006]. W autofagolizosomie następuje strawienie substratów przy



pomocy hydrolaz – enzymów lizosomalnych. Powstałe produkty są źródłem substancji pokarmowych, które komórka wykorzystuje do przeżycia na najniższym poziomie zużycia energii. Najczęściej spotykana w komórkach jest makroautofagia, kontrolowana przez produkty genu *Atg* (ang. *Autophagy-related gene*), zaangażowane w formowanie autofagosomu [Klinosky i Emr, 2000]. Proces ten jest regulowany obecnością lub brakiem substancji odżywczych. W środowisku bogatym w składniki odżywcze aktywowany jest szlak mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*), co prowadzi do zahamowania autofagii. Natomiast przy niedoborze składników pokarmowych w komórce indukowana jest autofagia, która może uratować komórkę lub też przyczynić się do jej śmierci. To stopień zaawansowania tego procesu decyduje o jego życiodajnej, bądź śmiertelnej roli w komórce [Klinosky i Emr, 2000].

Podczas embriogenezy jajnik cechuje się najwyższym odsetkiem komórek apoptotycznych. Programowanej śmierci ulegają komórki podlegające intensywnym podziałom mitotycznym: gonocyty, oogonia, oraz oocyty I rzędu. W komórkach takich stwierdza się ekspresję głównych markerów apoptozy tj.: kaspazy 3, fragmentarycznego białka PARP1 oraz fragmentację DNA (pozytywna reakcja TUNEL) (Ghafari i wsp., 2007; Lobascio i wsp., 2007; Klinger i wsp., 2015). W rozwoju postnatalnym tempo podziałów spada, a mejotyczne oocyty zamknięte w pęcherzykach unikają śmierci apoptotycznej (Tingen i wsp., 2009 a, b). Ważną rolę w rozwoju oocytu odgrywa wówczas środowisko tworzone przez pęcherzyk jajnikowy, wzajemne interakcje pomiędzy oocytem, komórkami ziarnistymi i tekalnymi (Orisaka i wsp., 2009). Oocyty hodowane *in vitro*, pozbawione kontaktu z komórkami ziarnistymi, znacznie częściej ulegają apoptozie [Yang i Rajamahendran, 2002]. W ultrastrukturze degenerujących oocytów pęcherzyków pierwotnych i I- rzędowych szczura, nie obserwuje się kondensacji chromatyny, fragmentacji jądra czy też ciałek apoptotycznych, natomiast w cytoplazmie widoczne są liczne wakuole [Devine i wsp., 2000]. Badania dowodzą, że postnatalne oocyty mogą doświadczać innego rodzaju śmierci programowanej a mianowicie autofagii [Ortiz i wsp., 2006; Escobar i wsp., 2008]. Ponadto niektóre oocyty wykazują koekspresję zarówno kaspazy 3 jak i białka autofagalnego Lamp1, co sugeruje występowanie śmierci „kombinowanej” [Ortiz i wsp., 2006; Escobar i wsp., 2008]. Badania zdają się potwierdzać fakt, iż gromadzenie w komórce autofagosomów może poprzedzać apoptozę [Gonzales-Polo i wsp., 2005]. Niezmiernie ważny jest fakt, iż oba te procesy mogą przechodzić jeden w drugi w zależności od obecności różnorodnych czynników wewnątrzkomórkowych. Stwierdzono wzajemne powiązanie ścieżek sygnałowych apoptozy i autofagii . Z doniesień

wynika, że istnieją białka wspólne dla obu tych procesów np.: Bcl-2 oraz anty-apoptotyczne białko Bcl-2 [Pattingre i wsp., 2005].

Jednym z warunków utrzymania homeostazy w jajniku jest zachowanie równowagi pomiędzy komórkami proliferującymi a umierającymi. Mechanizm regulacji liczby komórek odbywa się na poziomie kontroli ich podziałów i śmierci programowanej. Dlatego też proliferacja i różnicowanie się komórek są równie naturalnymi procesami fizjologicznymi jak apoptoza czy autofagia, które zachodzą w komórkach jajnika zarówno podczas jego rozwoju prenatalnego jak i postnatalnego.

Główny wątek prowadzonych przeze mnie badań dotyczył udziału wyżej opisanych procesów w atrezji pęcherzyków jajnikowych. Swoje badania oparłam na trzech modelach zwierzęcych: myszy kolczystej (*Acomys cahirinus*), śwince morskiej (Kawia domowa, *Cavia porcellus*) i świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*). Gatunki te, pomimo iż należą do odmiennych jednostek taksonomicznych charakteryzują się zaawansowaną organogenezą w momencie narodzin. Folikulogeneza w jajniku badanych zwierząt rozpoczyna się już w okresie życia płodowego (u myszy i szczura laboratoryjnego dopiero w okresie neonatalnym) [Hułas i wsp., 2003; Bielańska-Osuchowska, 2006, Sun i wsp., 2014]. Ponadto ich rozwój prenatalny w wielu aspektach przypomina rozwój płodu ludzkiego, co czyni je odpowiednimi modelami doświadczalnymi w badaniach biomedycznych.

W pierwszej publikacji zgłoszonej do cyklu habilitacyjnego: **Hułas-Stasiak M. i Gawron A. (2011) Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary. *Apoptosis* 16:967-975** obserwacje objęły ogólną budowę jajnika myszy kolczystej oraz szczegółową analizę procesów prowadzących do degeneracji pęcherzyków jajnikowych w okresie postnatalnym.

Jajniki nowo narodzonej (1 dniowej) oraz 7- dniowej myszy kolczystej charakteryzowały się zaawansowaną budową histologiczną. W części korowej widoczne były pęcherzyki jajnikowe, wśród których najliczniejszą populację stanowiły pęcherzyki pierwotne leżące tuż pod nabłonkiem. W głębszych warstwach kory znajdowały się pęcherzyki I-rzędowe oraz wielowarstwowe pęcherzyki II-rzędowe. Większość pęcherzyków pierwotnych i I-rzędowych doświadczała atrezji. Zmiany degeneracyjne obserwowano głównie w oocycie, a nie w komórkach go otaczających (ziarnistych). Badania immunofluorescencyjne nie wykazały obecności markera apoptozy - aktywnej kaspazy 3 oraz pozytywnej reakcji TUNEL w obumierających oocytach pęcherzyków jajnikowych. Stwierdzono natomiast silny immunosygnal markera autofagii – białka Lamp1. Analiza ultrastruktury degenerujących pęcherzyków ujawniła występowanie cech charakterystycznych dla autofagii. Cytoplazma

oocytów zawierała liczne wakuole, autofagosomy oraz autofagolizosomy. Nie obserwowano typowej dla przebiegu apoptozy kondensacji i fragmentacji chromatyny jądrowej. Atrezja w mniejszym stopniu dotyczyła pęcherzyków II-rzędowych. Tylko pojedyncze komórki ziarniste były TUNEL-pozytywne, natomiast oocyty wykazywały słaby immunosygnal w kierunku autofagalnego białka Lamp1.

Począwszy od 14 dnia życia postnatalnego w jajniku myszy kolczystej obserwowano redukcję pęcherzyków pierwotnych i I-rzędowych oraz rozwój nowej generacji pęcherzyków jajnikowych tj. pęcherzyków antralnych. Większość pęcherzyków w tym stadium wykazywała zmiany degeneracyjne. Silny immunosygnal dla aktywnej kaspazy 3 i reakcji TUNEL obserwowano w komórkach ziarnistych pęcherzyków trzeciorzędowych (antralnych). Pozytywnej reakcji nie stwierdzono w oocytach. W 21 i 30 dniu życia postnatalnego warstwa komórek ziarnistych pęcherzyków antralnych ulegała różnicowaniu. Można było w niej wyróżnić komórki antralne – zlokalizowane blisko jamki, komórki muralne leżące na błonie podstawnej oddzielającej warstwę granulozy od osłonki wewnętrznej oraz komórki ziarniste wzgórka jajonośnego. Szczególnie silny immunosygnal dla aktywnej kaspazy 3 i reakcji TUNEL wykazywały komórki antralne oraz komórki ziarniste znajdujące się wewnątrz jamki pęcherzyków. Analiza ultrastruktury komórek ziarnistych pęcherzyków antralnych potwierdziła, iż komórki te umierają na drodze apoptozy. W jamce pęcherzyka atretycznego widoczne były liczne ciała apoptotyczne. Silny immunosygnal na obecność białka Lamp1 lokalizowano głównie w atretycznych oocytach pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych. Słaba reakcja widoczna była zaś w oocytach pęcherzyków II-rzędowych i antralnych. Badania western-blot wykazały wzrost ekspresji aktywnej kaspazy 3 od 14 dnia życia postnatalnego. Z kolei ekspresję białka Lamp1 odnotowano we wszystkich badanych okresach życia postnatalnego samicy, ze szczególnym jej wzrostem w jajniku jednodniowej myszy.

### **Wnioski**

1. Oba procesy apoptoza i autofagia są zaangażowane w atrezję pęcherzyków jajnikowych.
2. Procesy te są komórkowo-specyficzne oraz zależne od stadium rozwojowego pęcherzyka.
3. Oocyty atretycznych pęcherzyków pierwotnych i I-rzędowych ulegają śmierci autofagalnej, zaś komórki ziarniste pęcherzyków II-rzędowych i antralnych śmierci apoptotycznej.
4. W pierwszym tygodniu po narodzinach samice doświadczają atrezji pęcherzykowej na drodze autofagii, w późniejszym okresie życia postnatalnego (14-30 dni) dominującą formą degeneracji pęcherzyków jest apoptoza.

Badania nad potencjałem rozwojowym oocytów nabierają obecnie coraz większego znaczenia zarówno w medycynie jak i hodowli zwierząt. Poznanie mechanizmów kontrolujących atrezję pęcherzyków jajnikowych pozwoliłoby na ograniczenie tego procesu, a co za tym idzie, pełniejsze wykorzystanie potencjału rozrodczego oraz przedłużenie zdolności reprodukcyjnych samic. Poznanie molekularnych szlaków kierujących śmiercią oocytów otworzy nowe możliwości doskonalenia warunków hodowli *in vitro* oocytów, które przeznaczone są do celów eksperymentalnych i terapeutycznych. Kolejnym istotnym aspektem badań jest opracowanie nowych terapii niepłodności oraz terapii antynowotworowych.

Przyjmując, że wszystkie procesy fizjologiczne zachodzące w zdrowym organizmie mają swoje uzasadnienie nasuwa się szereg pytań dotyczących roli atrezji pęcherzyków jajnikowych w prawidłowym funkcjonowaniu jajnika. Z pewnością pęcherzyki rozpoczynające wzrost jak i te ulegające degeneracji uczestniczą w tworzeniu wewnątrz-jajnikowego środowiska hormonalnego determinującego właściwy przebieg folikulogenezy. Tak więc, atrezja jest fizjologicznym procesem odgrywającym istotną rolę zarówno w eliminacji nadliczbowych pęcherzyków, wadliwych oocytów jak i przebiegu cyklu jajnikowego. Należy jednak podkreślić, iż niezależnie od pozytywnych aspektów udziału śmierci programowanej (apoptozy, autofagii) w degeneracji pęcherzyków jajnikowych, atrezja pęcherzykowa może zostać nadmiernie zaktywowana i prowadzić do wielu poważnych chorób.

Atrezja pęcherzyków jajnikowych może być indukowana różnymi czynnikami środowiskowymi, niewłaściwą dietą, stosowanymi ksenobiotykami i lekami oraz zaburzeniami hormonalnymi. Nadmierna degeneracja oocytów i pęcherzyków jajnikowych jest szczególnie niebezpieczna w okresie prenatalnym. U wielu gatunków zwierząt w tym również u człowieka folikulogeneza rozpoczyna się już w płodowych jajnikach, dlatego też ustalenie właściwej puli komórek rozrodczych i prawidłowy rozwój pęcherzyków jajnikowych ma istotne znaczenie dla osiągnięcia sukcesu reprodukcyjnego. W okresie płodowym obserwuje się istnienie tzw. okienek czasowych, w których rozwój jajnika jest szczególnie wrażliwy na działanie różnorodnych związków chemicznych. Te okresy krytyczne determinują prawidłowe funkcjonowanie gonady po uzyskaniu dojrzałości płciowej. Powyższe zagadnienia stanowiły inspirację do podjęcia przeze mnie badań dotyczących zaburzeń rozwoju płodowych jajników wybranych gatunków zwierząt, narażonych na działanie akryloamidu, deksametazonu i kwasu  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowego (HMB). Uważam, że problem ten wydaje się szczególnie istotny w świetle doniesień o wzrastającej liczbie niepłodnych par.

Zatem kolejna praca z cyklu habilitacyjnego: **Hułas-Stasiak M. i wsp. (2013) Maternal acrylamide treatment reduces ovarian follicle number in newborn guinea pig offspring.**

*Reproductive Toxicology* 42:125-131 dotyczyła określenia wpływu akryloamidu podawanego ciężarnym świnkom morskim na rozwój jajnika ich potomstwa.

Akryloamid to substancja powszechnie występująca w wysoko przetworzonej żywności (np.: w pieczywie, kawie, chipsach, frytkach, herbatnikach) dymie tytoniowym czy piwie [Tareke i wsp., 2002]. Związek ten z łatwością przenika przez powierzchnię skóry, barierę jelitową a nawet przez łożysko [Cebi, 2016]. Istotne wydaje się zatem zbadanie oddziaływania tego związku na prenatalne procesy rozwojowe, tym bardziej, że badania naukowe wskazują na jego genotoksyczne, mutagenne i kancerogenne działanie [Dearfield i wsp., 1988; Sakamoto i Hashimoto, 1986].

W przeprowadzonych przez mnie doświadczeniach akryloamid w dawce 3 mg/kg/dzień podawano ciężarnym świnkom morskim począwszy od 32 dnia ciąży do momentu porodu. Morfologicznie zróżnicowany jajnik obserwuje się u świnki morskiej już w 30 dniu po zapłodnieniu. W tym okresie widoczne są liczne oogonia/oocyty zebrane w gniazda, zaś pęcherzyki pierwotne i I-rzędowe obserwowano w 40, a drugorzędowe w 50-60 dniu po zapłodnieniu [Sun i wsp. 2014]. Okres narażenia płodowych jajników na akryloamid pokrywał się z czasem tworzenia pęcherzyków pierwotnych i ich tranzycją do stadiów bardziej zaawansowanych w rozwoju. Dlatego też istotna wydała się odpowiedź na pytanie, czy akryloamid podawany w okresie prenatalnym wpływa na procesy związane z atrezią pęcherzyków jajnikowych. Analizując jajniki nowo narodzonych samic z grupy traktowanej akryloamidem zaobserwowano redukcję puli pęcherzyków pierwotnych stanowiących „rezerwę jajnikową”, której uszczuplenie może zmniejszyć potencjał rozrodczy dojrzałej samicy. Ponadto, szczegółowa analiza ilościowa wykazała mniejszą liczbę „zdrowych” (bez oznak degeneracji oocyty) pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych. Z kolei istotnie statystycznie wzrosła liczba atretycznych pęcherzyków pierwotnych i I-rzędowych. Zmian takich nie obserwowano w przypadku pęcherzyków II-rzędowych. Redukcja pęcherzyków pierwotnych i zwiększenie liczby pęcherzyków atretycznych w grupie samiczek traktowanych prenatalnie akryloamidem może sugerować nasilenie procesów programowanej śmierci komórek. W celu wyjaśnienia obserwowanych zaburzeń zbadalam apoptozę i autofagię w jajniku nowo narodzonych świnek morskich. W efekcie wykazałam wyższy procent apoptotycznych oocytów (dodatnich pod względem sygnału dla aktywnej formy kaspazy 3 i reakcji TUNEL) w pęcherzykach pierwotnych i I-rzędowych po zastosowaniu akryloamidu. Natomiast słaby immunosygnał na obecność białka Lamp1 - markera autofagii odnotowano w oocytach pęcherzyków jajnikowych, co sugeruje, że degenerujące oocyty nie obumierają na drodze śmierci autofagalnej. Powyższe badania wskazują, że akryloamid uszczupla pulę

oocytów, indukując w nich apoptozę. Wiadomo, że akryloamid zaburza w komórce organizację pośrednich filamentów wimentynowych, prowadząc do nieprawidłowości w cyklu komórkowym bądź też jego zahamowania [Gall i wsp., 1992]. Przeprowadzone badania wykazały, że akryloamid może niszczyć filamenty wimentynowe pęcherzykowych oocytów prowadząc do ich degeneracji. Dane literaturowe wskazują, iż aktywne kaspazy doprowadzają do proteolizy filamentów wimentynowych, a w konsekwencji do apoptozy komórki [Byun i wsp., 2001].

### **Wnioski**

1. Akryloamid podawany prenatalnie redukuje pulę pęcherzyków pierwotnych oraz zwiększa atrezję pęcherzyków jajnikowych.
2. Akryloamid niszczy sieć filamentów wimentynowych i indukuje proces apoptozy w oocytach.

Podsumowując rezultaty w opisaney pracy stwierdzam, że akryloamid wywiera toksyczny wpływ na oocyty, indukując w nich zmiany apoptotyczne. Uszczuplenie „rezerwy jajnikowej” może ograniczać potencjał rozrodczy samicy i prowadzić do zaburzeń funkcjonowania jajnika u dorosłej samicy. Przeprowadzone badania wnoszą nowe informacje dotyczące, jak dotąd słabo opisanego, prenatalnego wpływu akryloamidu na folikulogenezę.

Podczas rozwoju prenatalnego płód ma zdolność adaptacji metabolicznej do niekorzystnych warunków środowiska wewnątrzmacicznego, a proces ten nazywany jest „programowaniem płodowym”. Programowanie płodowe oznacza więc zmiany strukturalne i czynnościowe niektórych komórek, tkanek i narządów, które zachodzą przy istniejących ograniczeniach. Zmiany te początkowo korzystne, bo przystosowujące organizm do aktualnych potrzeb, mogą wiązać się z ryzykiem wystąpienia poważnych chorób, nie tylko w okresie neonatalnym ale również w późniejszym życiu osobniczym.

Liczne badania wykazały, że endogenne glikokortykosteroidy (GKS) odgrywają istotną rolę w mechanizmie hormonalnej regulacji rozwoju narządów płodu i jego adaptacji do zmieniających się warunków środowiska wewnątrzmacicznego [Fowden i wsp., 1998].

Glikokortykoidy syntetyczne w tym, deksametazon, ze względu na swoje właściwości przeciwzapalne i immunosupresyjne są stosowane również w czasie ciąży np.: u kobiet chorych na astmę, dla zmniejszenia częstotliwości powikłań i umieralności noworodków, w terapii zapobiegania wrodzonego zespołu nadnerczowo-płciowego i innych. Pomimo niewątpliwych korzyści płynących z ich stosowania wzrost endogennych glikokortykoidów wywołany czynnikami stresogennymi, jak również podawanie syntetycznych glikokortykoidów, powoduje wiele negatywnych efektów min. zahamowanie wzrostu płodu [Langdown i Sugden

2001], zmniejszenie rozmiaru łożyska [Hewitt i wsp., 2006; O'Connell i wsp., 2011], zaburzenie osi podwzgórzowo-nadnerczowej [Lesage i wsp., 2001], utratę masy kostnej [Chen i wsp., 2018].

Biorąc pod uwagę powyższe problemy związane z zastosowaniem GKS w okresie prenatalnym postanowiłam zbadać wpływ deksametazonu na rozwój jajnika myszy kolczystej. Efektem tego eksperymentu jest trzecia praca stanowiąca osiągnięcie naukowe: **Hulaś-Stasiak M. i wsp. (2016) Prenatally administered dexamethasone impairs folliculogenesis in the spiny mouse offspring. *Reproduction, Fertility and Development* 28:1038-1048.** Wyniki analizy morfologicznej wykazały, iż podawany prenatalnie deksametazon redukował pulę „zdrowych” (bez oznak degeneracji) a zwiększał ilość atretycznych pęcherzyków pierwotnych w jajniku nowo narodzonych samiczek. Niemniej jednak całkowita liczba pęcherzyków pierwotnych była porównywalna z grupą kontrolną. Nie obserwowano istotnych statystycznie zmian w liczbie zdrowych i atretycznych pęcherzyków I-rzędowych, zarówno w grupie kontrolnej jak i traktowanej deksametazonem. Co ciekawe, deksametazon zwiększał całkowitą liczbę pęcherzyków II-rzędowych, wśród których zdecydowana większość to pęcherzyki ze zmianami atretycznymi. Dalsze analizy immunohistochemiczne potwierdziły przypuszczenia o indukcji atrezji po prenatalnym podaniu deksametazonu. Pęcherzyki degenerujące wykazywały pozytywną reakcję na obecność markera apoptozy (formy aktywnej kaspazy 3) oraz autofagii (białka Lamp1) głównie w obrębie oocyta. Białka te zlokalizowano również w komórkach ziarnistych pęcherzyków II-rzędowych. W większości degenerujących oocytów obserwowano kolokalizację kaspazy 3 i białka Lamp1. Po zastosowaniu deksametazonu, w pęcherzykach jajnikowych stwierdzono zwiększenie intensywności barwienia immunohistochemicznego na obecność wyżej wymienionych markerów śmierci komórkowej, co potwierdziły również badania western-blot. Ponadto odnotowano wzrost liczby oocytów wykazujących jednoczesną ekspresję kaspazy 3 i białka Lamp1, co sugeruje występowanie śmierci kombinowanej, w której szlaki autofagii i apoptozy mogą łączyć się ze sobą.

Wiadomo, że deksametazon wywiera bezpośredni wpływ na jajnik poprzez aktywację receptorów glikokortykosteroidowych (GR). W przeprowadzonych doświadczeniach wykazałam obecność receptora GR w cytoplazmie i jądrze oocytów, w komórkach ziarnistych, nabłonku powierzchniowym i komórkach stromy a w grupie eksperymentalnej obserwowałam wzrost ekspresji receptora GR.

### **Wnioski**

1. Podawany prenatalnie deksametazon zwiększał atrezję pęcherzyków pierwotnych i II-rzędowych wywołując zmiany degeneracyjne w oocyte.
2. Deksametazon indukował śmierć oocytów głównie na drodze autofagii lub śmierci kombinowanej.
3. Deksametazon przyspieszał tranzycję (przejście) pęcherzyków I-rzędowych do stadium pęcherzyka II-rzędowego.

Rezultaty tych badań wskazują, iż wzrost ilości degenerujących oocytów, w skutek prenatalnej ekspozycji jajnika na deksametazon, może uszczuplać pulę komórek rozrodczych, a tym samym ograniczać potencjał rozrodczy dojrzałej samicy. Uzyskane wyniki sugerują ostrożne aplikowanie deksametazonu w okresie ciąży. Coraz więcej badań wskazuje, iż syntetyczne glikokortykoidy wywierają heterogenne efekty na zdolności reprodukcyjne samic a ich działanie biologiczne zależy od dawki, drogi podania oraz czasu stosowania leku. Wiadomo też, że nadmierna ekspozycja na glikokortykoidy w okresie życia płodowego w większym stopniu upośledza prawidłowy rozwój gonad niż u osobników dorosłych, którym są one podawane w okresie postnatalnym. Syntetyczne glikokortykoidy mogą zwiększać zdolności rozrodcze zwierząt. Stymulują uwalnianie gonadotropin oraz prolaktyny z przysadki mózgowej [Tohei i Kogo 1999; Rockwell i Koos 2009], przyspieszają rozwój pęcherzyków jajnikowych [Tohei i wsp., 2000; Yang i wsp., 2001], zwiększają liczbę owulujących oocytów [Esmaeilzadeh i wsp., 2011; de Greef i van der Shoot, 1987]. Dlatego też, związki te z powodzeniem są wykorzystywane w leczeniu różnych zaburzeń płodności u kobiet [Badawy i wsp., 2007; Smith, 1965]. Zatem w kolejnej pracy: **Hulas-Stasiak M. i wsp. (2017) The effects of dexamethasone administered during pregnancy on the postpartum spiny mouse ovary. *PLoS ONE* 12(8): e0183528 doi: 10.1371/journal.pone.0183528** postanowiłam zbadać postnatalny wpływ deksametazonu na jajnik ciężarnej samicy *Acomys cahirinus*. W poporodowych jajnikach (wyizolowanych w ciągu 24 godzin po porodzie) obserwowano wszystkie typy pęcherzyków jajnikowych od stadium pęcherzyka pierwotnego po pęcherzyk przedowulacyjny, co dowodzi, że proces folikulogenezy zachodzi nieprzerwanie przez cały okres ciąży. W grupie samic, którym podawano deksametazon odnotowano wzrost całkowitej liczby pęcherzyków II-rzędowych, antralnych i przedowulacyjnych w stosunku do grupy kontrolnej. Komórki ziarniste zdrowych pęcherzyków wykazywały wyższy indeks proliferacyjny (PCNA) w porównaniu do pęcherzyków z grupy kontrolnej. Z kolei warstwa granulozy pęcherzyków atretycznych charakteryzowała się niższym indeksem apoptotycznym. Ponadto w komórkach granulozy stwierdzono mniejszą intensywność barwienia immunohistochemicznego na



obecność aktywnej formy kaspazy 3. Równocześnie wykazałam, że ekspozycja na deksametazon w okresie ciąży prowadziła do spadku poziomu kaspazy 3 i białka pro-apoptotycznego Bax oraz wzrostu ekspresji białka Bcl-2. Uzyskane wyniki sugerują, że deksametazon wywiera anty-apoptotyczne działanie na komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych, co może stymulować ich rozwój i różnicowanie. Badania ujawniły również silniejszą reakcję immunohistochemiczną dla białka Lamp1 w warstwie ziarnistej pęcherzyków I-, II-rzędowych, antralnych i przedowulacyjnych po działaniu deksametazonu. W przypadku białka Bekliny1, intensywniejszy immunodocznyn obserwowano jedynie w oocytach pęcherzyków antralnych i komórkach ziarnistych pęcherzyków I-rzędowych. Być może deksametazon indukuje w komórkach granulozy autofagię, która chroni je przed śmiercią apoptotyczną i stanowi strategię przeżycia komórki.

Na szczególną uwagę zasługują obserwacje dotyczące ciała żółtego (CL) ciążowego. Detekcja fragmentacji DNA metodą TUNEL wykazała zmniejszenie ilości komórek apoptotycznych w ciążowym ciałku żółtym po działaniu deksametazonu, co potwierdziła także analiza ekspresji aktywnej formy kaspazy 3 oraz białka Bax w homogenatach jajnika. Obserwowano również zwiększenie indeksu proliferacyjnego w CL ciążowym *Acomys cahirinus*. Niezmiernie interesująca jest obecność markera PCNA w zróżnicowanych i nieproliferujących komórkach lutealnych. Również badania innych autorów potwierdzają ekspresję PCNA oraz Ki67 podczas luteolizy ciała żółtego szczura (Kiya i wsp., 1998), krowy (Quirk i wsp., 2013) oraz klaczy (Al-zi'abi i wsp., 2003). Sugeruje się, że obniżenie syntezy progesteronu podczas luteolizy może powodować ponowne wejście komórek w cykl komórkowy i predysponować je do śmierci apoptotycznej (Quirk i wsp., 2013). W oparciu o uzyskane wyniki stwierdziłam, że syntetyczny glikokortykoid hamuje apoptozę komórek CL ciążowego myszy kolczystej. Ponadto analiza ultrastruktury dużych komórek lutealnych wykazała, że większość z nich posiadała cechy charakterystyczne dla autofagii (liczne autofagosomy, autofagolizosomy oraz krople lipidowe). W prezentowanej pracy odnotowano wzrost ekspresji markerów autofagii – białek Lamp1 oraz Bekliny1 (niezbędnej do formowania autofagosomów). Badania immunohistochemiczne również wykazały silny odczyn reakcji na obecność białek Lamp1 i Bekliny1 w komórkach lutealnych. Dodatkowo wyższy poziom ekspresji anty-apoptotycznego białka Bcl-2 obserwowany po działaniu syntetycznego glikokortykoidu sugeruje, że nieudana aktywacja szlaku apoptozy może prowadzić do indukcji autofagii. Zgodnie z ostatnimi badaniami białko Bcl-2 może wchodzić w interakcje z Bekliną 1 regulując aktywność autofagii w komórce (Gaytan i wsp., 2008). Kompleks Bcl-2/Beklina 1 utrzymuje autofagię na poziomie fizjologicznym, co zapewnia komórce właściwą homeostazę

i przeżycie. Z kolei odłączenie Bcl-2 prowadzi do nadmiernej autofagii i śmierci komórki. Co ciekawe, w poporodowym jajniku myszy kolczystej z grupy eksperymentalnej nie zaobserwowano CL ciążowych znajdujących się w zaawansowanym stadium luteolizy. Otrzymane wyniki sugerują, iż indukowana deksametazonem autofagia promuje raczej przeżycie, a nie śmierć komórek lutealnych, co w konsekwencji może opóźniać strukturalną luteolizę CL i przedłużać jego funkcjonowanie.

### **Wnioski**

1. Deksametazon przyspiesza rozwój pęcherzyków jajnikowych, hamuje apoptozę i stymuluje rozwój warstwy ziarnistej.
2. Deksametazon indukuje autofagię w ciałku żółtym ciążowym i opóźnia strukturalną luteolizę.

Rezultaty tych badań wnoszą nowe informacje dotyczące deksametazonu jako induktora autofagii w tkance lutealnej. Prezentowane wyniki mogą mieć aplikacyjne zastosowanie w celu zwiększenia efektywności reprodukcyjnej zwierząt i/lub w leczeniu niewydolności ciała żółtego, spowodowanej przedwczesną luteolizą. Stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań, mających na celu określenie właściwości steroidogennych ciała żółtego po działaniu deksametazonu. Zarówno prenatalne jak i postnatalne stosowanie deksametazonu powodowało zmiany w morfologii jajnika myszy kolczystej. Niemniej jednak gonada w okresie prenatalnym jest bardziej wrażliwa na działanie deksametazonu, który indukując zmiany degeneracyjne oocytów przyczynia się do uszczuplenia tzw. rezerwy jajnikowej, co w przyszłości może prowadzić do obniżenia płodności samic. Uzyskane wyniki sugerują odmienny wpływ deksametazonu na komórki płciowe i somatyczne.

Ostatnia praca z cyklu habilitacyjnego: **Hułas-Stasiak M. i wsp. (2019) Maternal  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) supplementation during pregnancy affects early folliculogenesis in the ovary of newborn piglets. *Theriogenology* 128:91-100** dotyczy problemu prenatalnego programowania żywieniowego, które zostało zdefiniowane jako zależność pomiędzy dietą ciężarnej samicy a zdrowiem jej potomstwa w okresie postnatalnym. Moją uwagę przykuł suplement diety, kwas  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowy (HMB) będący metabolitem leucyny.

HMB jest obecnie jednym z najpopularniejszych suplementów żywieniowych stosowanych przez zawodowych sportowców i osoby aktywne fizycznie. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na bezpieczne i korzystne, antykataboliczne efekty jego działania. Szczególnie interesujące są badania dotyczące wpływu HMB na rozwój płodu. HMB suplementowany ciężarnym maciorom zwiększał urodzeniową masę ciała prosiąt, poprawiał

ich kondycję zdrowotną oraz mięsność [Wan i wsp., 2016]. Stymulował układ immunologiczny prosiąt [Flummer i wsp., 2012], zwiększał mineralizację kości, poprawiał parametry mechaniczne i strukturalne kości i chrząstki [Tatara i Śliwa, 2007; Blicharski i wsp., 2017]. Ponadto wzmacniał siłę mięśni oraz usprawniał ich metabolizm białkowy [Wan i wsp., 2016]. Uzyskane dane sugerują potencjalne aplikacyjne zastosowanie HMB w medycynie prenatalnej. HMB mógłby być podawany ciężarnym matkom zagrożonym ryzykiem przedwczesnego porodu lub wykorzystany w profilaktyce i leczeniu IUGR (*ang. intrauterine growth retardation*, wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu), przyczyniając się do przyspieszenia wzrostu i dojrzewania narządów płodu, zwiększając tym samym jego szanse na przeżycie [Cieślak i Nieradka-Iwanicka, 2018]. Mimo wielu prac opisujących bezpieczne działanie HMB na płód, pojawiły się dane podważające potencjalne korzyści. Prenatalna ekspozycja na HMB zwiększała insulinooporność u prosiąt, co w przyszłości sprzyjałoby rozwojowi otyłości i cukrzycy [Wan i wsp., 2016], natomiast u nowo narodzonych samców myszy kolczystej obserwowano zaburzenia w rozwoju mózgu [Krawczyk i wsp. 2016]. W dostępnej literaturze brakuje danych dotyczących efektów działania HMB na układ rozrodczy, a w szczególności na gonady, których prawidłowe funkcjonowanie jest warunkiem istnienia gatunku. Z tego względu podjęty problem badawczy jest nowatorski.

W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach, HMB w dawce 0.2 g/kg/dzień podawano ciężarnym maciorom pomiędzy 70 a 90 dniem ciąży. Okres ten w płodowych jajnikach pokrywał się z czasem tworzenia pęcherzyków pierwotnych i ich tranzycji do pęcherzyków pierwszorzędowych [Bielańska-Osuchowska, 2006]. Badania wykazały, że podawany prenatalnie HMB znacząco redukował liczbę gniazd oocytów oraz pęcherzyków pierwotnych w jajniku nowo narodzonych prosiąt. Ponadto w obrębie gniazd oocytów odnotowano wyższy procent komórek apoptotycznych oraz niższy indeks proliferacyjny w stosunku do grupy kontrolnej. Dodatkowo po zastosowaniu HMB w jajniku prosiąt wykazałam spadek ekspresji E-kadheryny (białko połączeń przylegania) oraz zmniejszenie intensywności barwienia immunohistochemicznego na obecność tego białka w gniazdach. W oparciu o uzyskane wyniki stwierdziłam, że prenatalne działanie HMB obniża poziom E-kadheryny, zakłóca równowagę pomiędzy apoptozą i proliferacją, co może przyspieszać rozpad gniazd i redukować liczbę oocytów, a w konsekwencji pulę pęcherzyków pierwotnych. Co ciekawe, równocześnie ze zmniejszeniem zasobu rezerwy jajnikowej, w grupie prosiąt traktowanych HMB odnotowano większą liczbę pęcherzyków wzrastających tj. I-rzędowych i form przejściowych. Komórki ziarniste pęcherzyków wzrastających charakteryzowały się wyższym indeksem proliferacyjnym, co przyspieszało rozwój pęcherzyków oraz ich tranzycję ze stadium

pęcherzyka pierwotnego do I-rzędowego i dalej do stadium przejściowego. Badania biochemiczne wykazały, że suplementacja ciężarnych macior HMB zwiększała stężenie gonadotropin FSH, LH oraz hormonów steroidowych (estradiolu, testosteronu i progesteronu) w surowicy krwi prosiąt.

Przedstawione dane sugerują, iż HMB zaburza homeostazę hormonalną płodu oraz wczesne etapy folikulogenezy, co w konsekwencji może prowadzić do dysfunkcji gonady w okresie rozrodczym samicy.

### **Wnioski**

1. HMB redukuje pulę pęcherzyków pierwotnych, zwiększając apoptozę w gniazdach oocytów.
2. HMB przyspiesza tranzycję pęcherzyków jajnikowych.
3. HMB zmienia hormonalną homeostazę płodu.

Rezultaty wyżej opisanej pracy wnoszą nowe informacje na temat wpływu HMB na organizm płodu. Wyniki te zwracają uwagę na potrzebę monitorowania, czy zmiany w budowie i funkcjonowaniu jajnika noworodków prosiąt będą utrzymywały się w kolejnych okresach życia postnatalnego oraz czy będą miały wpływ na zdolności reprodukcyjne samic.

Wyniki badań przedstawione w piątej publikacji, zaliczanej do osiągnięcia naukowego, zostały otrzymane w ramach realizowanego przeze mnie projektu na pojedyncze działanie naukowe Miniatura 1 pt.: Wpływ kwasu  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowego (HMB) podawanego prenatalnie na strukturę i funkcjonowanie jajnika nowo narodzonych prosiąt (2017/01/X/NZ3/01055) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Reasumując, wyniki badań przedstawionych jako osiągnięcie naukowe podkreślają, iż płodowe jajniki są wrażliwe na działanie akryloamidu, deksametazonu oraz suplementu diety - kwasu  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowego (HMB). Czynniki te mogą w istotny sposób determinować funkcjonowanie gonady w okresie postnatalnym. Równowaga pomiędzy proliferacją a śmiercią komórek podczas rozwoju jajnika odgrywa zasadniczą rolę w ustaleniu się potencjału rozrodczego samicy, co warunkuje w przyszłości jej sukces reprodukcyjny. Nasilenie procesów atrezji prowadzi do znacznego uszczuplenia puli pęcherzyków jajnikowych. Podobnie, przyspieszenie rozwoju pęcherzyków może wiązać się z przedwczesnym wygasaniem aktywności gonady, co w konsekwencji negatywnie wpływa na płodność samic.

## Literatura

1. Al-zi'abi MO, Watson ED, Fraser HM. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction*. 2003;125: 259–270.
2. Badawy A, Goda H, Ragab A. Induction of ovulation in idiopathic premature ovarian failure: a randomized double-blind trial. (2007). *Reprod Biomed Online* 2:215-9
3. Bielańska-Osuchowska Z. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reprod Biol* 2006;6:161–93.
4. Bielańska-Osuchowska Z. Struktura i funkcja komórki. Oogeneza, tom 6, PWN str. 154-184, 1994
5. Blicharski T, Tomaszewska E, Dobrowolski P, Hułas-Stasiak M, Muszyński S. A metabolite of leucine ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate) given to sows during pregnancy alters bone development of their newborn offspring by hormonal modulation. *PLoS One* 12 (2017) e0179693. doi: 10.1371/journal.pone.0179693.
6. Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differentiation* 2001;8:443-450.
7. Cebi A. Acrylamide in food, analysis, content and potential health effects. 2016. Chapter 4, page 61-87.
8. Chen Z, Zhao X, Li Y, Zhang R, Nie Z, Cheng X, Zhang X, Wang H. Course-, dose-, and stage-dependent toxic effects of prenatal dexamethasone exposure on long bone development in fetal mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. (2018), 351:12-20. doi: 10.1016/j.taap.2018.05.005.
9. Cieślak D and Nieradka-Iwanicka B.  $\beta$ -Hydroxy-  $\beta$ -methylbutyrate (HMB) supplementation during pregnancy and perinatal period in animals studies and possible application in humans. *J. Educ. Health Sport*. 8 (2018) 11-18. doi: [10.5281/zenodo.1183841](https://doi.org/10.5281/zenodo.1183841)
10. Cran D.G., Moor RM. The development of oocytes and ovarian follicles of mammals. *Sci. Prog. Oxf.* (1980) 66:371-382
11. De Greef WJ and van der Shoot SP. Effects of dexamethasone on ovarian activity in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* (1987) 116:350-356
12. Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research* 1988;195:45-77.
13. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB (2000) Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 63:1245-1952.
14. Escobar ML, Echeverria OM, Ortiz R, Vasquez-Nin GH (2008) Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis* 13:1253-1266.
15. Eskelien EL (2006) Roles of Lamp-1 and Lamp-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Asp Med* 27:495-502
16. Esmaeilzadeh S, Amiri MG, Basirat Z, Shirazi M. Does Adding Dexamethasone to Clomiphene Citrate Improve Ovulation in PCOS Patients? A Triple - Blind Randomized Clinical Trial Study. *Int J Fertil Steril*. (2011) 1:9-12.
17. Flummer C, Kristensen, NB., Theil PK, Body composition of piglets from sows fed the leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in late gestation. *J. Anim. Sci.* 90 (2012) 442-444. doi: 10.2527/jas.53923.
18. Fowden AL, Li J., Forhead AJ. Glucocorticoids and the preparation for life after birth. Are these long-term consequences of the life insurance? *Proc. Nutr. Soc.* (1998) 57:113-122
19. Gall L, De Smedt V, Ruffini S. Co-expression of cytokeratins and vimentin in sheep cumulus-oocyte complexes. Alteration of intermediate filament distribution by acrylamide. *Development Growth and Differentiation* 1992;34:579-587.
20. Gaytán M, Morales C, Sánchez-Criado JE, Gaytán F. Immunolocalization of beclin1, a bcl-2-binding autophagy related protein in the human ovary: possible relation to life span of corpus luteum. *Cell Tissue Res*. 2008;331: 509–517.
21. Ghafari F, Gutierrez CG, Hartshorne GM (2007) Apoptosis in mouse fetal and neonatal oocytes during meiotic prophase one. *BMC Dev Biol* 7:87.
22. Gonzales-Polo R, Boya P, Pauleau A, Jalil P, Larochette N, Souquere S, Eskelinen E, Pierron G, Saftig P, Kroemer G (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 118:3091-3102.

23. Guthrie H and Garrett. Apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Reprod. Suppl.* (2001) 58:17-29
24. Hartshorne GM, Lyrakou S, Hamoda H, Oloto E, Ghafari F (2009) Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection. *Mol Hum Reprod* 15:805-819.
25. Hewitt DP., Mark PJ., Waddell BJ., Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology* (2006) 147:5568-5574.
26. Hsueh A., Billig H., Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* (1994) 15:707-723
27. Hulas M, Gawron A, Orfin G (2003) A comparative study of ovary development in the precocial spiny mouse (*Acomys cahirinus*) and the altricial Norway rat (*Rattus Norvegicus*). *Isr J Zool* 49:307-313
28. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011) The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18:571-580
29. Kiya T, Endo T, Goto T, Yamamoto H, Ito E, Kudo R, Behrman HR. Apoptosis and PCNA expression induced by prolactin in structural involution of rat corpus luteum. *J Endocrinol Invest.* 1998;21: 276–283.
30. Klinger FG., Rossi V., De Felici M. Multifaced programmed cel death in the mammalian fetal ovary. *Int. J. Dev. Biol* (2015) 59:51-54
31. Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721
32. Krawczyk A., Rycerz K., Jaworska-Adamu J., Tomaszewska, E., Dobrowolski P. Calretinin expression in hippocampus of mouse offspring from dams treated with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Med. Weter.* 72 (2016) 423-429. doi: 10.21521/mw.5535.
33. Langdown ML, Sugden MC. Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2001) 185:109-117.
34. Lesage J, Blondeau B., Grino M, Breant B., Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces foetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* (2001) 142:1692-1670
35. Lobascio AM, Klinger FG, Scaldaferri ML, Farini D, De Felici M (2007) Analysis of programmed cell death in mouse fetal oocytes. *Reproduction* 134:241-252.
36. O'Connell BA., Mortiz KM., Roberts CT., Walker DW., Dickinson H. The placental response to excess maternal glucocorticoid exposure differs between the male and female conceptus in spiny mice. *Biol Reprod.* (2011) 85:1040-1047.
37. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F, (2009): Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2:9.
38. Ortiz R, Echeverria OM, Salgado R, Escobar ML, Vasquez-Nin GH (2006) Fine structural and cytochemical analysis of the process of cell death of oocytes in atretic follicles in newborn and prepubertal rats. *Apoptosis* 11:25-37.
39. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garugi R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927–939.
40. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM. Role of the cell cycle in regression of the corpus luteum. *Reproduction.* 2013;145: 161–175.
41. Sakamoto J, Hashimoto K. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice-effects on fertility and sperm morphology. *Archives of Toxicology* 1986;59:201-205.
42. Smith KD., Steinberger E., Perloff WH. Polycystic ovarian disease. *Am J Obstet Gynecol* (1965) 93:994-1001.
43. Sun SY., Zhang W., Han X., Huang RH., Shi FX. (2014) Cell proliferation and apoptosis in the fetal and neonatal ovary of guinea pigs. *Genetics and Molecular Research* 13:1570-1578.
44. Swanson MS (2006) Autophagy: eating for good health. *J Immunol* 177:4945-4951
45. Szoltys M, Słomczyńska M, Wojtowicz A, Pierścińska A (1999) Subpopulations of the granulosa layer differentiated by histo- and immunocytochemical methods in the preovulatory follicle of the rat. *Folia Histochem Cytobiol* 37:91-92
46. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Tornqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:4998-5006.

47. Tataru MR, Śliwa E, Krupski W., Prenatal programming of skeletal development in the offspring: effects of maternal treatment with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on femur properties in pigs at slaughter age. *Bone* 40 (2007) 1615-1622. doi: 10.1016/j.bone.2007.02.018.
48. Tingen C, Kim A, Woodruff TK (2009a) The primordial pool of follicle and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod* 15:795-803.
49. Tingen CM, Bristol-Gould SK, Kiesewetter SE, Wellington JT, Shea L, Woodruff TK (2009b) Prepubertal primordial follicle loss in mice is not due to classical apoptotic pathways. *Biol Reprod* 81:16-25.
50. Tohei A and Kogo H. Dexamethasone increases follicle-stimulating hormone secretion via suppression of inhibin in rats. *Eur J. Pharm* (1999) 386:69-74
51. Tohei A., Sakamoto S., Kogo H. Dexamethasone or triamcinolone increase follicular development in immature rats. *Jpn J Pharmacol* (2000) 84:281-286
52. Wan H., Zhu J, Shen, Y X. Xiang, X, Yin, H., Fang, Z., et al., Effects of dietary supplementation of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on sow performance and mRNA expression of myogenic markers in skeletal muscle of neonatal piglets. *Reprod. Domest. Anim.* 51 (2016) 134-42.
53. Yang JG, Yu CC, Li PS. Dexamethasone enhances follicle stimulating hormone-induced P450<sub>scc</sub> mRNA expression and progesterone production in pig granulosa cells. *Chin J Physiol.* 2001;44: 111–119.
54. Yang L., Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relations of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 70:159-169.

## V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Studia na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie ukończyłam w 2000 roku. Pracę magisterską zatytułowaną „Wpływ kwercetyny na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach nowotworowych jelita grubego człowieka ” wykonałam w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii pod kierunkiem Prof. dr hab. Antoniego Gawrona. Praca ta stanowiła część badań prowadzonych w w/w Zakładzie na temat wpływu naturalnych flawonoidów na indukcję śmierci komórkowej w liniach nowotworowych. W pracy wykazałam, że kwercetyna wywiera cytotoksyczne działanie na komórki raka jelita grubego (LS 180) indukując w nich apoptozę i nekrozę. Wyniki tych badań oraz doniesienia innych autorów sugerują, że kwercetyna może być skutecznym adiuwantem w terapii przeciwnowotworowej.

Po ukończeniu z wyróżnieniem studiów magisterskich, w roku 2000 rozpoczęłam pracę jako asystent w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii. W ramach pracy doktorskiej pt. "Budowa i funkcjonowanie gonady żeńskiej *Acomys cahirinus* (Desmarest, 1819) w okresie postnatalnym." przeprowadziłam analizę histologiczną oraz histochemiczną dotyczącą struktury jajnika myszy kolczystej począwszy od okresu neonatalnego do późnej starości. W aspekcie porównawczym zaplanowałam również badania gonad u gatunków należących do tej samej rodziny tj. myszy i szczura laboratoryjnego. Powyższe gatunki różnią się, między innymi, długością ciąży, która u *A. cahirinus* trwa dwukrotnie dłużej niż u pozostałych myszowatych.

Tak podjęte zadanie badawcze miało dostarczyć informacji jak przedłużony okres ciąży wpływa na rozwój i funkcjonowanie jajnika u potomstwa. Prowadząc te badania wykazałam, że jajniki myszy kolczystej w okresie pourodzeniowym są bardziej zaawansowane w rozwoju, a folikulogeneza rozpoczyna się już w okresie życia prenatalnego. Jednak pomimo bardziej złożonej budowy gonady w momencie narodzin, gatunek ten osiąga dojrzałość płciową nieco później (około 90 dnia) niż inne myszowate. U myszy kolczystej stwierdziłam występowanie nielicznych pęcherzyków przedowulacyjnych oraz ciałek żółtych, co wiąże się z niewielką liczbą młodych w miocie (1-5). Pierwsze oznaki starzenia się narządu obserwowałam u 2,5-letniej samicy, a gonady w 3-4 roku życia charakteryzowały się zanikiem pęcherzyków jajnikowych i rozrostem tkanki łącznej. Zbadałam również lokalizację receptorów estrogenowych (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ), androgenowych (AR) oraz progesteronu (PR) w jajniku myszy kolczystej. ER $\beta$  był dominującym typem receptora estrogenowego w jajniku myszy kolczystej. Ponadto analiza rozmieszczenia receptorów hormonów steroidowych ujawniała dynamiczne zmiany zachodzące w ich ekspresji podczas procesu folikulogenezy. Wyniki mojej pracy doktorskiej zostały opublikowane łącznie w trzech pracach (**Hułas i wsp. 2003, poz. II.A.a.1; Hułas-Stasiak i Gawron 2007, poz. II.A.a.2; Hułas-Stasiak i Gawron 2010, poz. II.A.b.1**). Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, w listopadzie 2007 roku, dalej kontynuowałam pracę w swoim macierzystym Zakładzie, gdzie od października 2008 roku do chwili obecnej jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta. W 2009 roku odbyłam miesięczny staż w Zakładzie Immunologii i Patologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt PAN w Olsztynie. Miałam tam możliwość zapoznania się z techniką prowadzenia hodowli komórkowych. Zostałam włączona do badań prowadzonych przez zespół Prof. dr. hab. Dariusza Skarżyńskiego. Izolowałam komórki ziarniste z pęcherzyków jajnikowych oraz komórki lutealne z ciała żółtego krowy i kłaczy. Zakładałam hodowle komórkowe, które poddawałam działaniu różnorodnych czynników (czynniki wzrostu, prostaglandyny, oksytocyna). Poznałam metodę ELISA badając poziom stężenia estradiolu, progesteronu, prostaglandyn i oksytocyny w medium hodowlanym. Analizowałam poziom transkryptów w badanych próbkach RNA przy użyciu metody real-time PCR. W trakcie pobytu na stażu w ramach zebrania Towarzystwa Biologii Rozrodu wygłosiłam referat pt. „Ekspresja receptorów hormonów steroidowych w jajniku myszy kolczystej w okresie neonatalnym i postnatalnym” poświęcony mojej tematyce badawczej. Po powrocie skupiłam się na badaniach stanowiących główny nurt moich prac badawczych, a dotyczących zagadnień atrezji pęcherzyków jajnikowych i efektu prenatalnego narażenia gonad na deksametazon, akryloamid i kwas  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowy (HMB). Badania te stanowią podstawę osiągnięcia naukowego



prezentowanego w pierwszej części autoreferatu. Znaczną ich część realizowałam w ramach indywidualnego grantu Prorektora UMCS ds. Badań Naukowych i Współpracy Międzynarodowej (Atrezja pęcherzyków jajnikowych u niedojrzałych płciowo myszy kolczystych (*Acomys cahirinus*) oraz kierowanego przeze mnie projektu NCN Miniatura 1 pt. Wpływ kwasu  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowego (HMB) podawanego prenatalnie na strukturę i funkcjonowanie jajnika nowonarodzonych prosiąt. 2017/01/X/NZ3/01055. Równolegle z prowadzeniem badań dotyczących mojego osiągnięcia naukowego, współpracowałam z zespołem Dr hab. Ewy Tomaszewskiej z Katedry Fizjologii Wydziału Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Brałam udział w eksperymentach dotyczących prenatalnego wpływu badanych przeze mnie związków na inne układy min. układ szkieletowy i pokarmowy. Badania wykazały silny anaboliczny efekt kwasu  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowego na szkielet noworodków świni domowej. Obserwowano wzrost parametrów geometrycznych, mechanicznych i histomorfologicznych kości. Dodatkowe analizy wykazały również podwyższoną zawartość proteoglikanów i kolagenu w chrząstce stawowej. Wynikiem tych prac było współautorstwo dwóch publikacji naukowych: **Blicharski i wsp. 2017, poz. II.A.b.7, Tomaszewska i wsp. 2015, poz. II.D.2**. Ponadto prenatalna suplementacja HMB powodowała wzrost masy niektórych narządów wewnętrznych (płuc, wątroby, serca, śledziony, nerek) noworodków myszy kolczystej, co sugeruje iż HMB przyspieszał procesy metaboliczne w komórkach. Zaobserwowano, że efekt działania HMB zależał od tego czy był on podawany w środkowej czy też w końcowej fazie ciąży (**Muszyński i wsp. 2016, poz. II.D.3**). Z kolei deksametazon podawany w okresie płodowym upośledzał prawidłowy rozwój szkieletu myszy kolczystej. Obniżał liczbę komórek, zawartość proteoglikanów oraz cienkich włókien kolagenowych w chrząstce stawowej kości udowej. (**Iwaniak i wsp. 2016, poz. II.A.b.5**). W kolejnych badaniach dotyczących prenatalnego programowania wykazano toksyczny wpływ akryloamidu na strukturę jelita cienkiego noworodków świnki morskiej. Obserwowano większą liczbę uszkodzonych kosmków i krypt jelitowych, zmniejszenie grubości błony śluzowej i powierzchni absorpcyjnej (**Tomaszewska i wsp. 2014, poz. II.A.b.4**).

Poza pracami eksperymentalnymi jestem też autorką rozdziału w książce, w którym podsumowałam ówczesny stan wiedzy na temat wpływu akryloamidu podawanego ciężarnym samicom na organogenezę ich potomstwa (**Hulas-Stasiak i wsp. 2016, poz. II.D.1**). Uczestniczyłam również w doświadczeniach, które wykazały iż fundektomia znacząco pogarsza właściwości kości i chrząstki, a podawanie kwasu 2-oksoglutarynowego w diecie jest w stanie znacząco zredukować jej skutki uboczne (**Tomaszewska i wsp. 2016, poz. II.A.b.6**). W ramach dalszej współpracy wykazano, że deoksynivalenol (DON) – mykotoksyna

zanieczyszczająca paszę zwierząt hodowlanych może indukować objawy osteopenii w kościach długich norki amerykańskiej (Tomaszewska i wsp. 2017, poz. II.A.b.8). Następne doświadczenia, dotyczące wpływu dodatków paszowych na parametry układu szkieletowego ujawniły, iż pasza, w której soja, będąca jednym z jej głównych składników, została zastąpiona nasionami ciecierzycy polepsza parametry mechaniczne i geometryczne oraz mikroarchitekturę kości broilerów kury domowej (Muszyński i wsp. 2018, poz. II.A.b.9).

Dobra znajomość technik histologicznych, identyfikacji apoptozy oraz immunohistochemii pozwoliły mi na realizację wspólnych projektów z Dr hab. Martą Fiołką z Zakładu Immunobiologii UMCS. W trakcie badań stwierdzono, że różne tkanki i komórki (płyn celomatyczny, celomocyty, tkanki jelita, tkanki kokonów) dżdżownicy *Dendrobaena veneta* wykazują aktywność przeciwbakteryjną typu lizozymu, a pobudzenie układu immunologicznego dżdżownicy powodowało istotny wzrost tej aktywności. Z jelita *D. veneta* wyizolowano bakterię *Raoultella ornithinolytica*, która wytwarza metabolity o działaniu antygrzybowym i przeciwnowotworowym (przeciw komórkom HeLa, komórkom raka piersi T47D oraz raka jajnika TOV-112). Ponadto stwierdzono, że płyn celomatyczny dżdżownicy również wykazuje aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek raka płuc A549, raka jajnika TOV-112, i raka szyjki macicy HeLa. Obecnie we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi, prowadzone są dalsze badania nad aktywnością przeciwnowotworową płynu celomatycznego. Poszukiwanie biologicznie aktywnych związków o działaniu antynowotworowym czyni go interesującym pod względem aplikacyjnym. Efektem mojego udziału w tych badaniach jest współautorstwo dwóch prac oryginalnych (Fiołka i wsp. 2012, poz. II.A.b.2; Fiołka i wsp. 2013, poz. II.A.b.3).

## VI. Plany naukowe

Moje najbliższe plany badawcze obejmują kontynuację badań we wszystkich nurtach opisanych powyżej. W ramach projektu MINIATURA 1 finalizuję pracę dotyczącą prenatalnego wpływu HMB na ekspresję czynników wzrostu zaangażowanych w rozwój pęcherzyków pierwotnych i wzrastających (tj.: Kit ligand, podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1) oraz jego receptor IGF1R, morfogenetyczny czynnik wzrostu kości 4 (BMP4) w jajniku prosiąt. Przeprowadzone analizy wykazały, iż HMB zmienia ekspresję czynników wzrostu regulujących wczesną folikulogenezę, co powoduje nieprawidłowości w morfologii jajnika a w przyszłości może prowadzić do dysfunkcji gonady. Praca zatytułowana Regulation of folliculogenesis by growth

*factors in piglet ovary exposed prenatally to  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB)* jest na etapie przygotowania do publikacji.

W swoich planach uwzględniłam również kontynuację badań dotyczących indukcji autofagii w ciążowym ciałku żółtym (CL) myszy kolczystej po działaniu deksametazonu. Otrzymane wyniki sugerują, iż obserwowana autofagia promuje raczej przeżycie, a nie śmierć komórek lutealnych, co w konsekwencji może opóźniać strukturalną luteolizę CL i przedłużać jego funkcjonowanie. W dalszej kolejności planuję zbadanie interakcji pomiędzy Bcl-2 i białkiem Bcl-2 (metoda immunoprecypitacji) oraz aktywności steroidogennej CL, określając ekspresję enzymów zaangażowanych w syntezę hormonów steroidowych. Materiał do badań został już pozyskany i wymaga odpowiednich analiz.

## VII. Podsumowanie aktywności naukowej

| Dane bibliometryczne                                                                                                                                                                                                                         | Liczba publikacji | IF <sup>1</sup> | Punkty MNiSW <sup>2</sup> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego                                                                                                                                                                                           | 5                 | 15,157          | 170                       |
| Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego):<br>A) przed uzyskaniem stopnia doktora<br>B) po uzyskaniu stopnia doktora          | 2<br>9            | 18,057          | 260                       |
| Publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR:<br>A) przed uzyskaniem stopnia doktora<br>B) po uzyskaniu stopnia doktora                                             | 0<br>3            | 0               | 16                        |
| Liczba streszczeń naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych:<br>A) przed uzyskaniem stopnia doktora<br>B) po uzyskaniu stopnia doktora                                                                          | 5<br>30           | -               | -                         |
| Łączna liczba publikacji * Razem = 19<br><sup>1</sup> - IF zgodnie z rokiem opublikowania<br><sup>2</sup> - MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania<br>* Wykaz wszystkich prac obejmujących mój dorobek naukowy przedstawiono w Załączniku nr 3 | 19                | 33,214          | 446                       |
| <b>Ocena bibliometryczna:</b>                                                                                                                                                                                                                |                   |                 |                           |
| Całkowita liczba cytowań bez autocytowań wg Web of Science:                                                                                                                                                                                  |                   | 80              |                           |
| Całkowita liczba cytowań bez autocytowań wg Scopus:                                                                                                                                                                                          |                   | 88              |                           |
| Indeks Hirscha (wg Web of Science)                                                                                                                                                                                                           |                   | 6               |                           |
| Indeks Hirscha (wg Scopus)                                                                                                                                                                                                                   |                   | 7               |                           |

Monika Hułas-Stasiak