

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



Dr med. vet. Paweł Kordowitzki, Dipl. ECAR

Autoreferat

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Toruń, 2023

Spis treści

1.	Imię i nazwisko	3
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem: podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	3
3.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4.	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.....	4
4.1	Tytuł habilitacyjnego osiągnięcia naukowego	4
4.2	Lista publikacji wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe wraz z danymi bibliometrycznymi.....	4
4.3	Omówienie problematyki badawczej podejmowanej w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego	5
4.4	Cel podejmowanych badań w ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego.....	10
4.5	Wyniki oraz omówienie badań wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego.....	11
4.6	Podsumowanie i wnioski.....	24
4.7	Bibliografia	25
5.	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	36
6.	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	38
6.1	Osiągnięcia dydaktyczne	38
6.2	Osiągnięcia organizacyjne i popularyzatorskie.....	39
7.	Inne informacje dotyczące kariery zawodowej	40

1. Imię i nazwisko

Paweł Kordowiczki

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem: podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2013: **Dyplom lekarza weterynarii (lek. wet.)**
Freie Universitaet Berlin, Fachbereich Tiermedizin, Berlin, Niemcy
- 2016: **Doctor medicinae veterinariae (Dr med. vet.)**
Freie Universitaet Berlin, Fachbereich Tiermedizin, Berlin, Niemcy
Temat: Tail-tip necrosis in fattening bulls.
Promotor: Prof. Kerstin E. Mueller, wyróżnienie: *“Magna cum laude”*
- 2019: **Diplomate of European College of Animal Reproduction (Dipl. ECAR)**
University of Liege, Liege, Belgia
Europejska specjalizacja: Rozród zwierząt i biotechnologie rozrodu

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2013 - 2014: **Klinika Ginekologii, Położnictwa i Andrologii, Wydział Medycyny Weterynaryj, Uniwersytet Justusa Liebiga, Giessen, Niemcy**
Doktorant i asystent naukowy w ramach Internship ECAR
- 2014 - 2017: **Instytut Friedricha Loefflera, Instytut Genetyki Zwierząt Gospodarskich Mariensee, Niemcy**
Doktorant i rezydent w ramach Residency ECAR
- 2016: **Uniwersytet New South Wales, Szkoła Nauk Medycznych, Cancer Research Center, Sydney, Australia**
Stypendysta międzynarodowy BAYER Foundation
- 2017- 2022 : **Instytut Rozrodu Zwierząt i Nauk Żywności Polskiej Akademii Nauk Zakład Immunologii i Patologii Rozrodu, Olsztyn, Polska**
Specjalista/ Lekarz weterynarii

2018: Narodowe Centrum Badań nad Rakiem (CNIO), Madryd, Hiszpania
Post-Doc w ramach projektu KNOW Consortium

2019 - obecnie: Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Nauk Biologicznych i
Weterynaryjnych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Toruń, Polska
Adiunkt (naukowo-dydaktyczny)

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

4.1 Tytuł habilitacyjnego osiągnięcia naukowego

„Molekularne mechanizmy i biomarkery starzenia reprodukcyjnego w oocytach”

4.2 Lista publikacji wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe wraz z danymi bibliometrycznymi

1. van der Reest J, Nardini Cecchino G, Haigis MC, **Kordowiczki P.** (2021).

“Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing.”

Ageing Research Reviews. DOI: 10.1016/j.arr.2021.101378.

IF: 11.3, MNiSW: 140, liczba cytowań: 38, (załącznik 3.1).

Udział własny: koncepcja oraz zaplanowanie manuskryptu, opracowanie graficzne, pomysłodawca tematyki naukowej oraz podsekcji pracy przeglądowej, pisanie głównej części i redagowanie końcowe manuskryptu, napisanie odpowiedzi na recenzje.

(autor korespondencyjny)

2. **Kordowiczki P,** Haghani A, Zoller JA, Li CZ, Raj K, Spangler ML, Horvath S. (2021).

„Epigenetic clock and methylation study of oocytes from a bovine model of reproductive aging.”

Ageing Cell. DOI: 10.1111/accel.13349.

IF: 11.003, MNiSW: 140, liczba cytowań: 11, (załącznik 3.2).

Udział własny: pomysłodawca badań, twórca hipotezy badawczej, koncepcja oraz zaplanowanie przebiegu badań laboratoryjnych, pobieranie materiału do badań, pobieranie materiału do badań, opracowanie wyników, przygotowanie i napisanie głównej części manuskryptu, napisanie odpowiedzi na recenzje.

(pierwszy autor)

3. Kordowiczki P, Graczyk S, Haghani A, Klutstein M (2023).

“Oocyte aging: A multifactorial phenomenon in a unique cell.”

Aging and Disease. DOI: 10.14336/AD.2023.0527.

IF: 9.968, MNiSW: 140, liczba cytowań: 0, (załącznik 3.3).

Udział własny: koncepcja oraz zaplanowanie manuskryptu, opracowanie graficzne, pomysłodawca tematyki naukowej oraz podsekcji pracy przeglądowej, pisanie głównej części i redagowanie końcowe manuskryptu, napisanie odpowiedzi na recenzje.

(autor pierwszy i korespondencyjny)

4. Kordowiczki P, López de Silanes I, Guío-Carrión A, Blasco M. (2020).

“Dynamics of telomeric repeat-containing RNA expression in early embryonic cleavage stages with regards to maternal age.”

Aging (Albany-NY). DOI: 10.18632/aging.103922

IF: 5.682, MNiSW: 140, liczba cytowań: 2, (załącznik 3.4).

Udział własny: pomysłodawca badań, twórca hipotezy badawczej, koncepcja oraz zaplanowanie przebiegu badań laboratoryjnych, pobieranie materiału do badań, opracowanie wyników, opracowanie graficzne wyników, pisanie głównej części i redagowanie końcowe manuskryptu, napisanie odpowiedzi na recenzje.

(pierwszy autor)

Wszystkie wymienione prace zostały zrealizowane po uzyskaniu stopnia doktora oraz opublikowane w czasopiśmie indeksowanym w bazie Journal Citation Reports. Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie poszczególnych publikacji stanowią załączniki od 3.1.1 do 3.4.3.

Łącznie dla wyżej wymienionego cyklu publikacji:

- sumaryczny współczynnik oddziaływania **IF: 37.953**
- sumaryczna ilość punktów **MNiSW: 560**
- sumaryczna liczba cytowań według **Scopus: 51**

4.3 Omówienie problematyki badawczej podejmowanej w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego

Chociaż dokonano fundamentalnych postępów w medycynie rozrodu i technologii wspomaganego rozrodu w dziedzinie weterynarii, to czynniki i szlaki molekularne, które

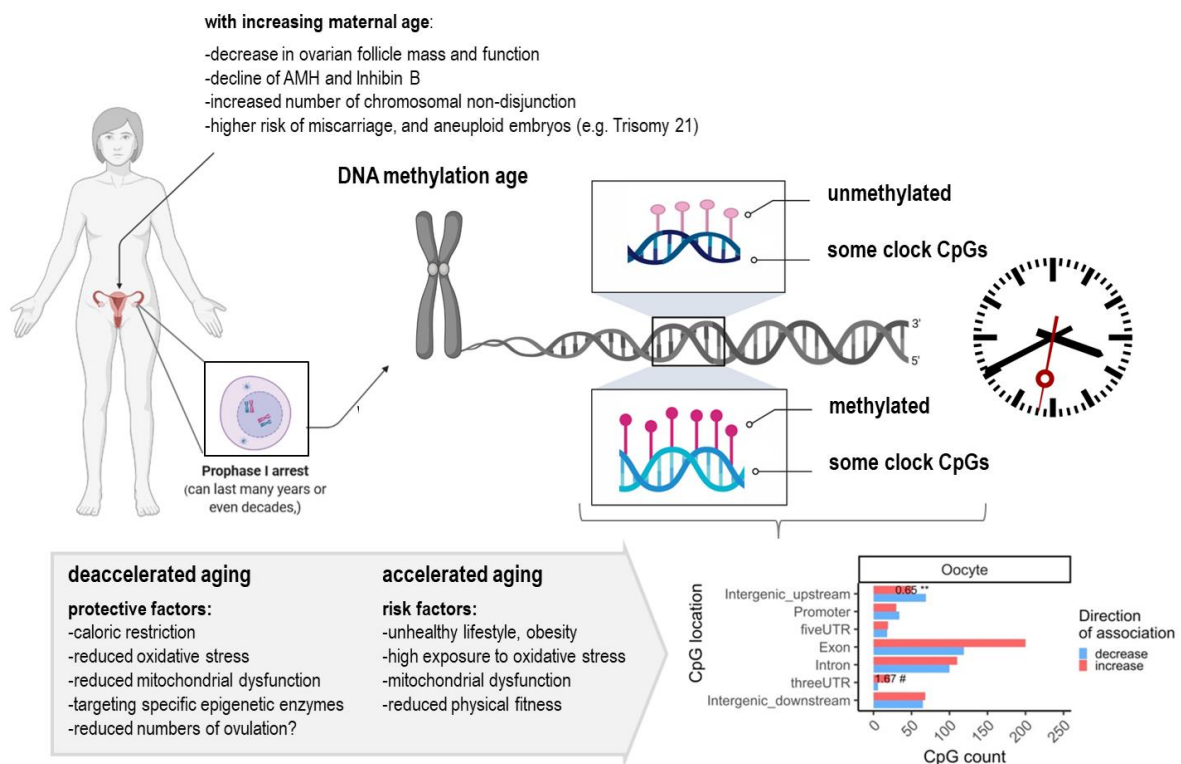
mogą mieć kluczowe znaczenie dla kompetencji rozwojowych oocytu, pozostają nie do końca wyjaśnione. Pierwsze zapłodnienie *in vitro* ludzkiej komórki jajowej miało miejsce ponad 40 lat temu, a od tamtej pory zostało przeprowadzone u wielu gatunków zwierząt na całym świecie, w tym u bydła mlecznego, zapewniając korzyści dla genetycznej selekcji krów. Mimo wieloletnich badań, odsetek blastocyst z *in vitro* pozostaje niski, zwłaszcza w przypadku oocytów od starszych dawczyń. Dlatego potrzebne są dalsze badania i nowe strategie terapeutyczne związane z regulacją starzenia się oocytów. Dane z ostatnich trzech dekad pokazują, że na płodność samic zwierząt domowych, zwłaszcza krów i kłaczy, jak i kobiet znaczący wpływ ma wiek matczyny oraz żywienie i ekspozycja na stres. Czynniki te wpływają na mikrośrodowisko jajnika, i w konsekwencji na oocyty w pęcherzykach jajnikowych oraz na ich metylację DNA. Fenotyp starzenia się oocytów jest złożoną kwestią ze względu na wpływ zdarzeń środowiskowych, podłoża genetycznego/rasowego, stresu oksydacyjnego i zmian epigenetycznych nagromadzonych od urodzenia samicy. Pomimo faktu, że molekularne podłoże procesu starzenia jest ograniczone do kilku wysoce zachowanych ewolucyjnie szlaków biologicznych, starzenie się oocytów nadal stanowi problem naukowy i kliniczny, nie tylko w medycynie weterynaryjnej, ale i ludzkiej. Związane z wiekiem, stopniowe obniżanie się potencjału rozrodczego jest cechą wspólną dla samic wielu gatunków, jednakże skuteczne sposoby przeciwdziałania temu procesowi nie zostały dotychczas odnalezione. Podstawowymi zjawiskami ograniczającymi płodność są zmniejszanie się rezerwy komórek jajowych oraz towarzyszące mu pogarszanie się ich jakości, określane jako „starzenie reprodukcyjne”, które jest konsekwencją zmian zachodzących z upływem czasu.

Proces **starzenia oocytów** obejmuje między innymi zmiany **telomerów**, **dysfunkcję mitochondriów**, **zmiany mikrośrodowiska w jajniku** i **modyfikacje epigenetyczne**, które

mają bezpośredni wpływ na związany z wiekiem spadek jakości komórki jajowej i późniejszy rozwój embrionalny po zapłodnieniu. Mitochondria stanowią dużą część cytoplazmy w oocytach, a architektura mitochondrialna jest inna w oocytach niż w komórkach somatycznych, charakteryzujących się bardziej okrągłym wyglądem. Choć liczba mitochondriów na oocyt jest wyższa niż w jakiegokolwiek innej komórce ssaka, ich liczba i aktywność maleją wraz z wiekiem. Jakość mitochondriów w oocytach decyduje o jakości oocytu i rozwijającego się zarodka, ponieważ mitochondria ojcowskie ulegają degradacji po zapłodnieniu. Mitochondria koordynują liczne procesy sygnalizacji metabolicznej, epigenetycznej, oraz reakcji redoks, które są niezbędne dla funkcjonowania komórek, a nowe badania wskazują, że dysfunkcja mitochondriów jest **kluczowym czynnikiem** przyczyniającym się do **starzenia się oocytów** u zwierząt i kobiet. Wcześniejsze badania wykazały, że epigenom przyczynia się do kontroli ekspresji genów i struktury chromatyny co przekłada się na jakość oocytów u starszych samic i kobiet (ryc.1). Oocyty pochodzące od dawczyń starczych mogą wykazywać nieprawidłową globalną metylację DNA, która jest związana z wyciszaniem transkrypcji genów w oocytach. W literaturze przedmiotu brakuje danych dotyczących wpływu zmian metylacji DNA w określonych *loci* związanych ze starzeniem, na potencjał rozwojowy oocytów. Informacje te znacznie przyczyniłyby się do rozwiązania problemu „starzenia reprodukcyjnego”. Poziom metylacji kilku *loci* DNA można wykorzystać do opracowania **dokładnego estymatora wieku epigenetycznego** (wiek metylacji DNA; DNAmAge), znanego jako zegar epigenetyczny, który odzwierciedla kilka aspektów wieku biologicznego/ chronologicznego. Ponadto niedawne odkrycia dotyczące skrócenia telomerów w jajniku i krwi, umożliwiły znalezienie nowych biomarkerów molekularnych i epigenetycznych związanych z homeostazą telomerów. Przyczyniają się one do wczesnego wykrycia dysfunkcji jajników przed zanikiem rezerwy jajnikowej oraz

poszukiwania nowych terapii niepłodności zwierząt i kobiet związanej z wiekiem. Telomery to końcowe fragmenty chromosomów, których główną funkcją jest zapewnienie stabilności chromosomów. Telomery ssaków składają się z powtarzających się sekwencji bogatych w Guaninę ($[T_2AG_3]_n$), powiązanych z nimi białek (kompleks shelterin) i RNA (TERRA). Z upływem czasu/wieku telomery stają się coraz krótsze, a działanie stresu oksydacyjnego może znacznie przyspieszać ten proces w oocytach. Długość telomerów w oocytach, oraz ekspresja Telomeric Repeat containing RNA (TERRA), może być wykorzystana w medycynie rozrodczej i weterynarii w celu wykrywania przyczyny niepłodności związanej ze starzeniem reprodukcyjnym. **Silna motywacja do rozwiązania problematyki badawczej** podejmowanej w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego wynika nie tylko z **oryginalności i nowatorstwa**, ale także z **interdyscyplinarności**. Mówiąc dokładniej, badanie niniejszego osiągnięcia łączy weterynarię, medycynę ludzką, biologię, i matematykę. Warto zauważyć, że nowatorskość i oryginalność osiągnięcia naukowego są spowodowane następującymi aspektami: (1) Do momentu opracowania przeze mnie problematyki, literatura naukowa nie oferowała żadnych doniesień na temat estimatorów matematycznych jako biomarkera starzenia reprodukcyjnego na podstawie profilu metylacji DNA oocytów. Dla dyscypliny weterynaria test to **zupełnie nowa wiedza, wygenerowana po raz pierwszy** w przedstawionym osiągnięciu w celu zrozumienia wpływu zmian metylacji DNA w oocytach w kontekście ich starzenia oraz wpływu, jaki mają te zmiany na ekspresję TERRA. (2) Wyniki uzyskane w niniejszym osiągnięciu mają potencjał wykrywania sposobów ewentualnego zapobiegania zmianom epigenetycznym lub spowalniania procesu starzenia w oocytach, w celu przedłużenia płodności samic i kobiet oraz zapobiegania aberracjom chromosomowym. Tym samym, uzyskane wyniki mogą przyczynić się do rozwiązania **globalnego problemu** dotyczącego

obniżenia jakości oocytów wraz z wiekiem. Biorąc pod uwagę ograniczenia etyczne dotyczące badań nad oocytami ludzkimi, **oocyty bydłęce** są powszechnym i atrakcyjnym modelem kompetencji rozwojowych oocytów. Ze względu na fakt, że proces starzenia w oocytach występuje bardzo wcześnie w życiu samic i kobiet w porównaniu z komórkami innych układów bądź narządów, problematyka badawcza przedstawiona w niniejszym osiągnięciu, która dotyczy starzenia oocytów, może stanowić bardzo ważny model wyjaśniający podstawowe procesy przyczyniające się do ogólnego starzenia organizmu.



Rycina 1. Starzenie i zmiany epigenetyczne w oocytach.

Schemat pokazujący konsekwencje zaawansowanego wieku matki (zwłaszcza u kobiet w wieku 35 lat i starszych) oraz przyspieszony proces starzenia, które wpływają na wiek metylacji DNA oocytów. Oocyty w pęcherzykach jajnikowych są zatrzymywane w profazie pierwszego podziału mejotycznego, a wraz z postępującym wiekiem matki, po wznowieniu mejozy występuje więcej błędów, co może prowadzić do aneuploidii u potomstwa (np. trisomia 21/zespół Downa). Skróty: AMH=Anti-Muellerian Hormone, DNMT= DNA methyltransferase, TDG= Thymine DNA glycosylase, TET= ten-eleven translocation.

4.4 Cel podejmowanych badań w ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego

Od 1980 roku uważa się, że do osiągnięcia dalekosiężnego celu, jakim jest zrozumienie, spowolnienie, zatrzymanie lub nawet odwrócenie procesu starzenia, potrzebne są **prawidłowe i wiarygodne biomarkery starzenia**. Badania i artykuły stanowiące podstawę przedłożonego osiągnięcia naukowego obejmowały zbadanie wpływu wieku matczynego na metylację DNA w komórkach jajowych, ekspresję TERRA od oocyty do stadium blastocysty oraz wpływu mitochondriów i mikrośrodowiska jajnikowego na jakość starzejącego się oocyty. Do momentu opublikowania pracy oryginalnej, nie było dostępnych publikacji, w których opisano, jaka jest ekspresja TERRA w oocytach i we wczesnym rozwoju zarodkowym do stadium blastocysty w gatunku bydłowym. Ponadto nie istniały naukowe badania dotyczące tematu biomarkera „starzenia reprodukcyjnego” w oparciu o profile telomerów, ekspresję TERRA oraz metylację DNA („zegar epigenetyczny oocytów”). Należało wznowić namysł nad tym starym dogmatem. Dlatego zadaniem niniejszego cyklu prac było wygenerowanie nowych danych na temat molekularnych ścieżek, stojących za niewyjaśnionym zagadnieniem starzenia reprodukcyjnego samic w celu stworzenia nowatorskiego biomarkera starzenia oocytów. Amerykańska federacja badań nad procesem starzenia (American Federation for Aging Research) zaproponowała następujące kryteria, które musi spełnić adekwatny biomarker starzenia: (a) musi przewidywać tempo starzenia, (b) musi monitorować podstawowy proces leżący u podstaw procesu starzenia, a nie skutki choroby, (c) musi mieć możliwość wielokrotnego testowania bez szkody dla człowieka, (d) musi być markerem, który zarówno dla ludzi, jak i zwierząt będzie odpowiednim estymatorem. Biomarker przedstawiony w niniejszym osiągnięciu naukowym, może stanowić zegar epigenetyczny oocytów, który wraz z długością telomerów/ekspresją TERRA i mitochondriami może w przyszłości być wykorzystany w **praktyce weterynaryjnej**, w

zespołach embriotransferu zwierząt domowych oraz w klinikach rozrodczych i leczenia niepłodności. Cykl prac przedstawia cztery cele:

- 1.) Opracowanie znaczenia mitochondriów dla starzenia oocytów;
- 2.) Opracowanie zegara epigenetycznego i badanie metylacji DNA oocytów bydłęcych;
- 3.) Opracowanie znaczenia mikrośrodowiska jajnika i epigenetyki dla starzenia oocytów;
- 4.) Opracowanie dynamiki ekspresji TERRA w oocytach i zarodkach zwierzęcych.

4.5 Wyniki oraz omówienie badań wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego

4.5.1 Znaczenie mitochondriów dla starzenia oocytów

(Publikacja I)

Oocyt jest uznawany za największą komórkę gatunku ssaków i innych organizmów wielokomórkowych. Mitochondria natomiast integrują wiele procesów istotnych dla funkcjonowania komórki, takich jak procesy metaboliczne związane z produkcją energii i biosyntezą, a także sygnalizacją Ca^{2+} i homeostazą reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species/ROS). Ponadto mitochondria są odpowiedzialne za adaptację komórek do różnych rodzajów stresorów, takich jak stres oksydacyjny czy uszkodzenie DNA. Przewyższenie zdolności adaptacyjnych mitochondriów do przywracania homeostazy przez te stresory, prowadzi do dysfunkcji mitochondriów [1]. Mitochondria działają jak niezbędne fabryki energii w oocytach, wspierając energetycznie wymagające procesy dojrzewania, zapłodnienia i rozwoju embrionalnego [1,2]. Wraz ze starzeniem się oocytów obserwuje się równoczesny spadek liczby i jakości mitochondriów, przy czym coraz więcej dowodów wskazuje na to, że funkcja mitochondriów jest krytycznym wyznacznikiem sprawności oocytów i zarodków [2]. Wywołało to zainteresowanie w dziedzinie weterynarii i medycynie rozrodczej. Szczególnie ze względu na oferowaną

możliwość lepszego zrozumienia, w jaki sposób mitochondria przyczyniają się do stosunkowo wczesnego starzenia się oocytów w porównaniu z innymi układami narządów oraz ewentualnych możliwości modulacji aktywności mitochondriów w celu przywrócenia sprawności oocytów. Opracowano kilka strategii terapeutycznych, prowadzących do zatrzymania, opóźnienia lub częściowego odwrócenia objawów starzenia się oocytów. Ponadto postęp techniczny doprowadził do coraz bardziej wyrafinowanych technologii wspomaganego rozrodu. Niemniej jednak bezpieczna i etyczna modulacja jakości mitochondriów i oocytów wymaga szerszego zrozumienia ich wzajemnego oddziaływania. Identyfikacja dostępnych i nieinwazyjnych biomarkerów jakości mitochondriów i oocytów byłaby szczególnie pomocna w ustaleniu, która strategia terapeutyczna jest najlepiej dopasowana do indywidualnych przypadków klinicznych. Reasumując, wyjaśnienie mechanizmów molekularnych, które przyczyniają się do dojrzewania i starzenia się oocytów oraz wyjątkowej roli mitochondriów w tym kontekście, a także staranne określenie strategii terapeutycznych w celu poprawy funkcji mitochondriów, a tym samym zdrowia oocytów, może przyczynić się do opracowania nowych metod zwiększania i przedłużania zdolności rozrodczej. Spadek jakości oocytów obserwowany w procesie starzenia wynika częściowo z regulacji epigenetycznej. Metabolity mitochondrialne są ważnymi produktami pośrednimi, które umożliwiają komunikację mitochondrialno-jądrową poprzez generowanie i modyfikację jądrowych znaczników epigenetycznych. Mitochondrialny pirogronian, cytrynian, octan, ketony, aminokwasy i beta-oksydacja lipidów mogą generować acetylo-CoA, substrat enzymów acetylotransferazy histonowej (HAT) [3, 4], o wysokiej energii i warunkach acetylo-CoA prowadzących do wzrostu acetylacji histonu i transkrypcji genów, podczas gdy niskie poziomy sprzyjają kondensacji chromatyny [5]. W przeciwieństwie do tego, rodzina sirtuinowych

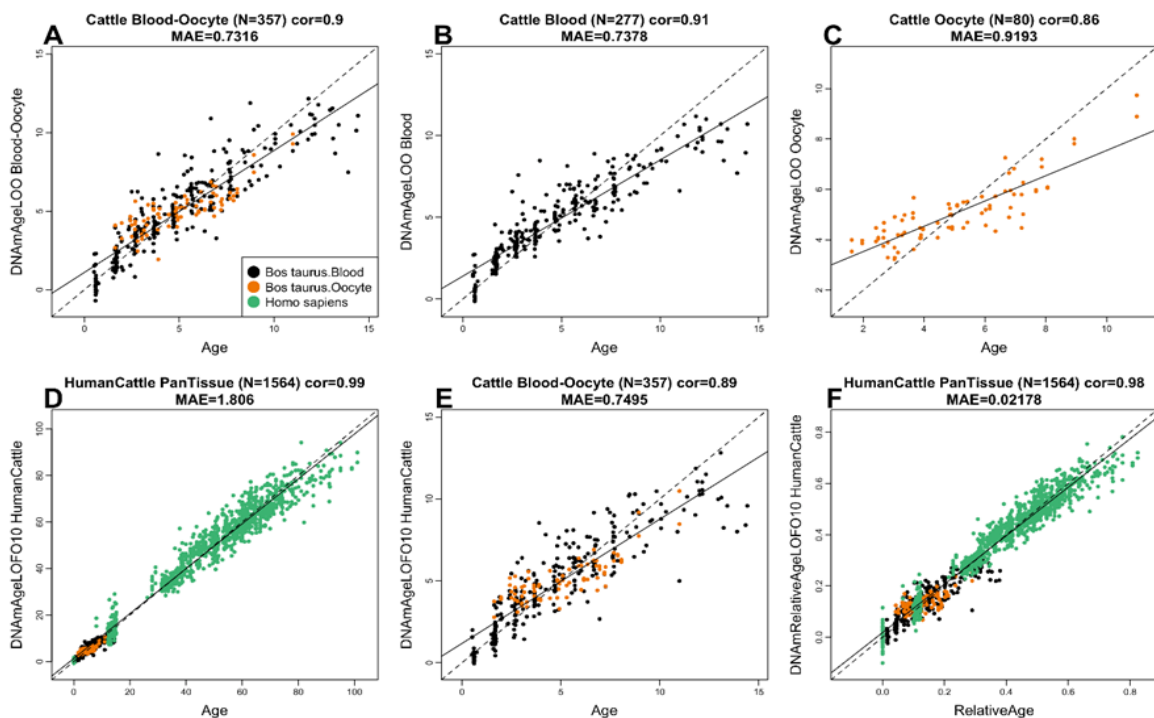
deacetylaz histonowych (HDACS) opiera się na NAD⁺ jako kofaktorze, a mitochondria mają kluczowe znaczenie w utrzymaniu homeostazy kofaktora NAD⁺/NADH. Demetylazy histonów (HDM) i metylotransferazy histonów (HMT) są odpowiedzialne za stan metylacji histonów. HMT opierają się na S-adenozylometioninie (SAM) jako donorze metylu, który jest generowany w cytozolowym cyklu metioninowo-homocysteinowym, który opiera się na mitochondrialnym cyklu kwasu foliowego i produkcji ATP [6]. Enzym ATP-cytrynian liazy (ACL) wytwarzający acetylo-CoA reguluje również metylotransferazę DNA 1 (DNMT1), wpływając w ten sposób na poziom metylacji DNA [7]. Oprócz wewnętrznych procesów mitochondrialnych, które utrzymują jakość w organellach, sieć mitochondrialna ma również kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy komórkowej poprzez swoją rolę w zarządzaniu apoptotyczną śmiercią komórek. Szlak zewnętrzny opiera się na sygnalizacji receptora śmierci, podczas gdy szlak wewnętrzny (lub mitochondrialny) może być aktywowany przez bodźce, takie jak zatrzymanie mitozy i uszkodzenie DNA [8]. Mitochondrialna kontrola apoptozy jest szczególnie istotna w przypadku oocytów, zważywszy, że liczba oocytów rekrutowanych podczas każdego cyklu rujowego, jest ściśle kontrolowana przez apoptozę, a przeżywa mniej niż jeden procent wszystkich komórek rozrodczych powstałych podczas oogenezy [9]. Sugeruje się, że zarówno upośledzona dynamika mitochondriów, jak i zmniejszona liczba mitochondriów w starych oocytach odgrywają kluczową rolę w płodności samic i żywotności oocytów [10-12]. W konsekwencji w komórce jajowej występuje zmniejszone zaopatrzenie energii [12,13]. Mitochondria oocytów ssaków wykazują stan spoczynku, zwłaszcza przed dojrzewaniem płciowym, z niewielką aktywnością bioenergetyczną i transkrypcyjną, co, jak się uważa, zapobiega dziedzicznym mutacjom mtDNA [14,15]. Identyfikacja dostępnych i nieinwazyjnych biomarkerów jakości mitochondriów i oocytów w zależności od wieku samicy byłaby

szczególnie pomocna w określeniu, która strategia terapeutyczna jest najlepiej dostosowana do indywidualnych przypadków klinicznych. Oznacza to, że wyjaśnienie mechanizmów molekularnych, które przyczyniają się do dojrzewania i starzenia się oocytów, z uwzględnieniem wyjątkowej roli mitochondriów w tym procesie, może przyczynić się do powstania nowych metod poprawy i przedłużenia sprawności reprodukcyjnej u zwierząt domowych i kobiet.

4.5.2. Zegar epigenetyczny i badanie metylacji DNA oocytów na modelu zwierzęcym (Publikacja II)

Oocyty dawczyń z podwyższonym wiekiem wykazują nieprawidłowe globalne poziomy metylacji DNA [16]. Badania przeprowadzone w ramach tej publikacji dotyczyły kilku kluczowych pytań, niezbędnych do stworzenia po raz pierwszy epigenetycznego zegara oocytów. W przedłożonym badaniu zostały wykorzystane bydlęce komórki jajowe i krew oraz DNA pochodzące od somatycznych komórek ludzkich, które zostały wykorzystane do osiągnięcia następujących celów: 1) sprawdzenia, czy zegar epigenetyczny odnoszący się do krwi ma również zastosowanie do oocytów; 2) opracowania zegara epigenetycznego dla oocytów bydlęcych; 3) skonstruowania zegarów epigenetycznych, które mają zastosowanie zarówno u bydła, jak i ludzi, aby umożliwić translację wyników badań; 4) oceny, czy przyspieszenie epigenetycznego wieku wykryte we krwi występuje również w oocytach; oraz 5) ustalenia związku między wiekiem a poziomem metylacji pojedynczych CpG w oocytach. Dane dotyczące metylacji DNA zostały wygenerowane z próbek DNA (n=357) od dawczyń oocytów (n=80) i dawczyń krwi (n=277) bydła (*Bos taurus*). Zwierzęta były w wieku od 0,5 do 13,3 lat w momencie pobierania próbek. Opracowano kilka, **bardzo dokładnych zegarów epigenetycznych** dla krwi bydła, oocytów bydła i obu tkanek łącznie. Te zegary epigenetyczne różnią się pod względem

parametrów operacyjnych, takimi jak: tkanka, gatunek i miara wieku. Aby opracować zegary dwugatunkowe, do zestawu treningowego dodano profile metylacji DNA z próbek ludzkich (n=852). Dane dotyczące metylacji zarówno dla tkanek bydłych, jak i ludzkich zostały wygenerowane z macierzy HorvathMammalMethylChip40, która składa się z około 36000 CpG osadzonych w sekwencjach DNA, które są wysoce konserwowane u ssaków. Znalaziono wysoki procent (45%) zachowanych genów i regionów między bydłem a ludźmi. Przedstawiono pokrycie macierzy ssaków genomu bydła (*Bos taurus*) ARS-UCD1.2 w oparciu o dopasowanie genomu do ludzkiego genomu Hg38. W sumie 31252 z 37540 sond zmapowanych do genomu bydła i około 71% z nich zmapowanych do tych samych genów u bydła i ludzi. Ten wysoki stopień sugeruje, że budowanie zegarów dwugatunkowych, które mają zastosowanie zarówno u ludzi, jak i bydła jest rzeczywiście możliwe (ryc. 2).



Rycina 2. Badanie walidacji krzyżowej zegarów epigenetycznych u bydła i ludzi.

A) Zegar krwi-oocytu dla bydła zastosowany do krwi i oocytów, B i E) Zegar bydła dla krwi, C) Zegar bydła dla

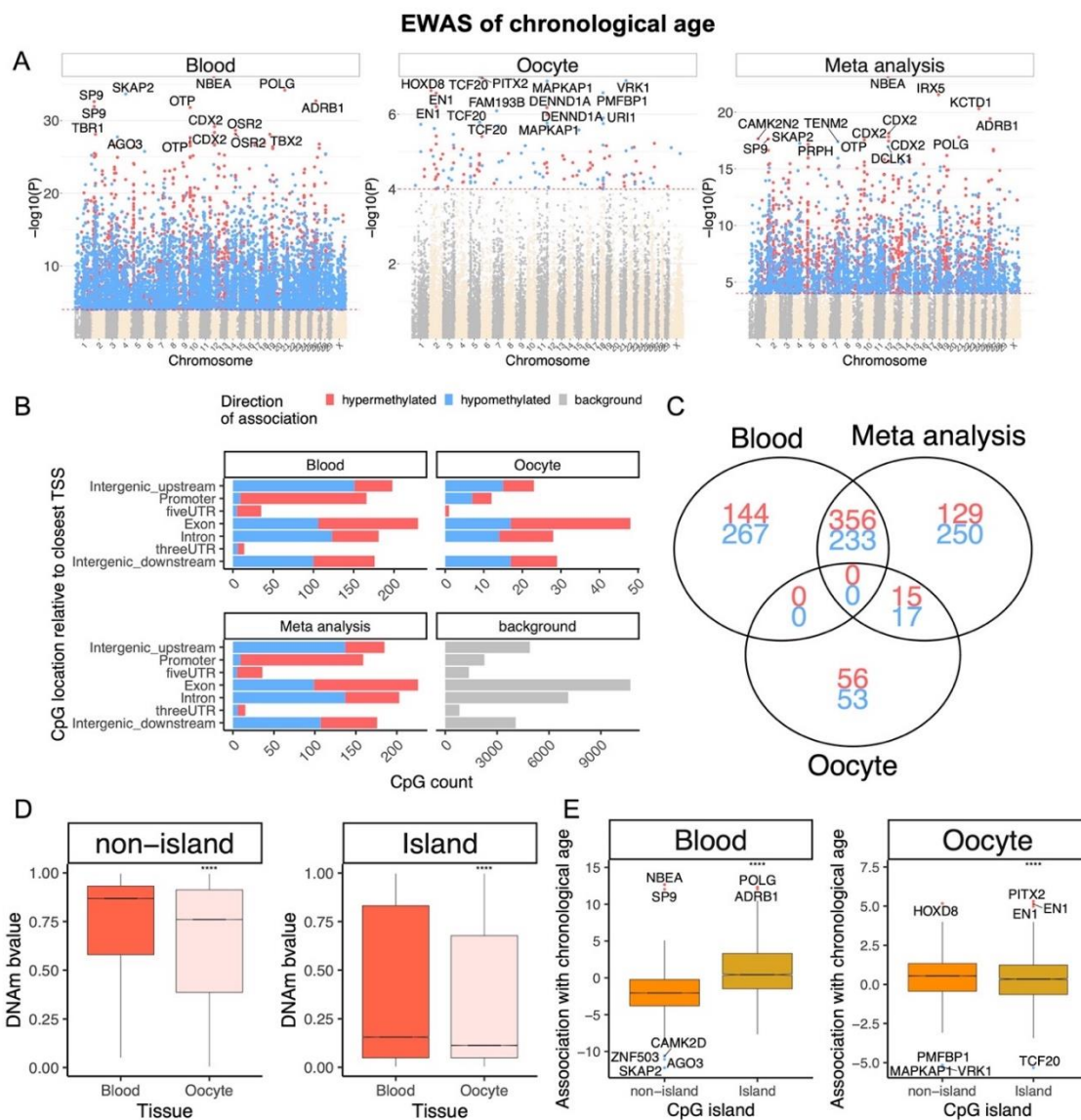
oocytów. Wiek chronologiczny (oś x, w jednostkach lat) w porównaniu z oszacowaniem wieku metylacji DNA (oś y, w jednostkach lat) z pominięciem jednej próbki (LOO). Kropki są pokolorowane według typu tkanki (pomarańczowe = komórki jajowe, czarne = krew). D i F) Dziesięciokrotna analiza walidacji krzyżowej zegara człowiek-bydło dla wieku (chronologicznego).

Dwa uzyskane zegary ludzko-bydłęce wykorzystywały ten sam zestaw CpG i to samo równanie przewidywania do oszacowania wieku obu gatunków. Przedstawione zegary dwugatunkowe można odróżnić miarą wieku. Podczas gdy jeden operuje wiekiem chronologicznym w jednostkach lat, drugi stosuje wiek względny, który jest stosunkiem wieku chronologicznego do maksymalnej długości życia gatunku i jest wyrażony jako wartości od 0 do 1 (ryc. 2F). Maksymalny wiek bydła i ludzi to odpowiednio 38 lat i 122,5 lat. Wysoka dokładność zegara ludzko-bydłęcego dla względnego wieku pokazuje, że zegar ten ułatwia biologicznie znaczące **porównanie między gatunkami** o różnej długości życia (bydło i człowiek). Zegar ludzko-bydłęcy generował korelację $r=0,99$ między wiekiem chronologicznym a wiekiem epigenetycznym, gdy oba gatunki analizowano razem. Korelacja była nieco niższa, gdy analiza była ograniczona do oocytów bydłęcych i próbek krwi ($r=0,89$).

Przeprowadzono również badanie asocjacyjne całego epigenomu (EWAS) dotyczące wieku chronologicznego w próbkach krwi bydłęcej i oocytów (ryc. 3). Wyniki ujawniły, że we krwi i oocytach występują wyraźne zmiany metylacji DNA zależne od wieku. Poszczególne CpG wykazywały **wysoce istotne korelacje z wiekiem we krwi i oocytach**. Wyniki z EWAS wykazały, że poszczególne wartości CpG we krwi bydła i oocytach były silnie związane z wiekiem. Oocyty i krew mają różne zestawy CpG związanych z wiekiem; z oocytami o znacznie mniejszej liczbie CpG związanych z wiekiem. Chociaż ponad 500 CpG było hipermetylowanych we krwi, tylko 71 i 70 CpG było odpowiednio hipermetylowanych i hipometylowanych w oocytach (rys. 3). Tę znaczną różnicę w

liczbie CpG związanych z wiekiem pomiędzy typami tkanek zaobserwowano również przy ograniczeniu analizy do próbek krwi i oocytów pochodzących od tych samych zwierząt. Górne zmiany DNAm są następujące: hipermetylacja w intronie NBEA we krwi i hipometylacja w regionie poniżej TCF20 w oocytach. W metaanalizie krwi i oocytów najwyższą zmianą DNAm była również hipermetylacja w intronie NBEA. Jedną z największych zmian DNAm w oocytach była w pobliżu genu DENND1A. Sugeruje się, że warianty genetyczne w DENND1A odgrywają rolę w podatności na zespół policystycznych jajników (PCOS), najczęstszą chorobę endokrynną u kobiet przed menopauzą. PCOS jest złożonym zaburzeniem charakteryzującym się niepłodnością, hirsutyzmem, otyłością, różnymi zaburzeniami miesiączkowania i powiększonymi jajnikami wysadzonymi atretycznymi (zwyrodniałymi) pęcherzykami [17]. Po pierwsze, CpG związane z wiekiem w promotorach genów wykazywały dodatnią korelację z wiekiem we krwi, ale nie w oocytach. Po drugie, żadna z powiązanych z wiekiem CpG nie była dzielona między krew i oocyty. W przypadku CpG poza wyspami CpG średni poziom metylacji w oocytach był znacznie niższy niż we krwi. Różnica była mniej wyraźna w przypadku wyspowych CpG. We krwi wyspy CpG wykazywały znacznie wyższe dodatnie powiązania z wiekiem niż CpG poza wyspami. Takiej charakterystyki [18] nie można było zaobserwować w oocytach. Co więcej, poza-wyspowe CpG w oocytach wydają się refrakcyjne wobec demetylacji wraz z wiekiem, co może odzwierciedlać fakt, że ich podstawowy stan metylacji był już stosunkowo niski i nie można go było dalej redukować. Niewiele CpG zostało nawet zidentyfikowanych z rozbieżnymi wzorcami starzenia DNA między krwią a oocytem. Wzbogacenie ludzkich tkankowo specyficznych stanów epigenomowych sugerowało, że hipermetylowane CpG we krwi są zlokalizowane w pobliżu dwuwartościowych/ zrównoważonych miejsc startu transkrypcji, flankujących dwuwartościowe TSS oraz dwuwartościowe wzmacniacze.

Cechy te podobnie zaobserwowano u ludzi [18]. Związane z wiekiem CpG znalezione w oocytach nie zostały wzbogacone o żadne epigenetyczne sygnatury typu tkanki. W przeciwieństwie do tego CpG związane z wiekiem znalezione we krwi zostały, zgodnie z oczekiwaniami, wzbogacone o sygnatury epigenetyczne krwi.



Rycina 3. Krew i oocyt wykazują wyraźne, zależne od wieku zmiany metylacji DNA.

A) Działki Manhattanu EWAS w wieku chronologicznym. Czerwona kropkowana linia odpowiada progowi istotności $p < 10^{-4}$. Poszczególne CpG są zabarwione na czerwono lub niebiesko, jeśli z wiekiem zyskują lub tracą metylację. 15 najbardziej znaczących CpG jest oznaczonych przez sąsiednie geny. B) Lokalizacja górnych CpG w każdej tkance jest

względna najbliższego miejsca startu transkrypcji. Wybrano najwyższe CpG ($p < 10^{-4}$). Szary kolor w ostatnim panelu reprezentuje lokalizację 31252 sond macierzowych BeadChip ssaków zmapowanych do genomu *Bos_taurus*.ARS-UCD1.2. C) Diagram Venna przedstawiający nakładanie się CpG związanych ze starzeniem na podstawie metaanalizy lub poszczególnych tkanek. D) Porównanie DNAm według stanu wyspy CpG we krwi i oocytach. Oocyty mają generalnie niższe poziomy DNAm w wyspach i innych CpG niż we krwi. E) Wykres statystyki Z testu korelacji wieku w funkcji stanu wyspy CpG we krwi i oocytach. Średnią różnicę zbadano za pomocą testu t. **** $p < 1e-4$.

Podstawowym celem pracy było opracowanie i zastosowanie epigenetycznych biomarkerów starzenia oocytów bydła jako modelu oocytów ludzkich. Mimo opracowania dwutkankowego zegara epigenetycznego, który przewidywał podobny wiek zarówno we krwi, jak i oocytach, uznano, że podstawowe właściwości starzenia się tych dwóch typów próbek znacznie się różnią. Stwierdzono, że tempo starzenia epigenetycznego jest wolniejsze w oocytach w porównaniu z krwią, jednak w oocytach proces starzenia zaczyna się w starszym wieku epigenetycznym. Różnice w efektach starzenia epigenetycznego między komórkami jajowymi a krwią zaobserwowano na poziomie poszczególnych CpG i kumulatywnie na poziomie pojedynczych zegarów epigenetycznych. Oczekuje się, że **zegary epigenetyczne dla oocytów** odpowiedzą na pytania z dziedziny starzenia się układu rozrodczego. W tym na główne pytanie: jak spowolnić starzenie się oocytów zwierząt i u kobiet?

4.5.3 Wieloczynnikowy wpływ mikrośrodowiska jajnika oraz epigenetyki na proces starzenia oocytu (Publikacja III)

Komórka jajowa jest uważana za największą komórkę ssaków i bardzo wyjątkową pod względem długości życia, ponieważ zmiany w jajnikach związane ze starzeniem są wykrywalne na bardzo wczesnym etapie życia [19]. Na ten fenomen składa się wiele kluczowych czynników. Ponadto ze względu na fakt, że oocyty są metabolicznie

aktywne, doświadczają skutków chronicznej ekspozycji na **wpływy środowiska i mikrośrodowiska**. Pomimo szybkiego zwiększania naszej wiedzy na temat starzejącego się metylomu, musimy jeszcze w pełni zrozumieć podstawowe mechanizmy leżące u podstaw zmian epigenetycznych związanych z wiekiem, które stanowią jedną z głównych cech starzenia [20]. Metylacja DNA bierze udział w wielu procesach biologicznych, w tym w regulacji ekspresji genów, inaktywacji chromosomu X i starzeniu [21]. Metylacja cytozyn, szczególnie 5-metylocytozyna (5mC) na promotorach genów prawie zawsze wiąże się z represją transkrypcji, w połączeniu z innymi mechanizmami wyciszania transkrypcji, takimi jak modyfikacje histonów. Ponieważ metylom działa jako jeden z ważnych interfejsów między genomem a środowiskiem, reaguje również na bodźce środowiskowe wynikające z czynników związanych z odżywianiem oraz dobrostanem zwierząt i ludzi [22]. Na przykład CpG zlokalizowane w kompleksach docelowych represora polycomb typu 2 mają tendencję do metylacji wraz z wiekiem – szczególnie w tkankach obwodowych [23]. Co ciekawe, modyfikacje histonów radykalnie zmieniają się wraz z wiekiem w oocytach. Jak niedawno wykazano, mysie i ludzkie oocyty tracą wraz z wiekiem heterochromatynowe markery histonowe [24]. Ta utrata powoduje masową aktywację elementów transpozycyjnych i retrotranspozonów, co skutkuje uszkodzeniem DNA. Zgodnie z tym wykazano, że hamowanie aktywności odwrotnej transkryptazy lub sztuczne zwiększanie poziomu heterochromatyny w starzejących się oocytach znosi uszkodzenia DNA i poprawia efektywność dojrzewania oocytów *in vitro*, gdy stosuje się je u starszych oocytów [24]. Białko Stella, znane również jako Dppa3 i Pgc7, ulega silnej ekspresji w pierwotnych komórkach rozrodczych [25,26]. Jego główne działanie opiera się na swoistej kontroli globalnej demetylacji DNA, umożliwiającej proces przebudowy epigenetycznej bezpośrednio po zapłodnieniu [27]. Podczas gdy demetylacja w męskich przedjądrach

jest niemal natychmiastowa, proces ten jest opóźniony w żeńskich przedjadrach zygoty [28]. Biorąc pod uwagę kluczową rolę białka Stella dla oocyty, jego niedobór w mysim modelu „high-fat-diet” (HFD) doprowadził do hipometylacji elementów transpozycyjnych [29]. Co ciekawe, indukowanie nadekspresji białka Stella może w pewnym stopniu zapobiegać powyższym defektom poprzez hamowanie nadmiernej akumulacji 5-hmc, ale niektóre *loci* genomowe nie reagowały na wzrost aktywności Stella [30]. Dane te sugerują, że pomimo ważnej funkcji białka Stella w utrzymaniu metylacji DNA, mogą istnieć inne czynniki przyczyniające się do globalnej hipometylacji w oocytach otyłych matek różnych gatunków ssaków. Problem ten dotyczy również jałówek i krów ras mlecznych, u których zbyt wysoka kondycja ciała wpływa negatywnie na ich płodność i indukuje również zmiany epigenetyczne samic. W nawiązaniu do zmian epigenetycznych, warto zwrócić uwagę na fakt, że najpowszechniejszą modyfikacją jest metylacja szóstego azotu w adenozyne, która jest przenoszona z ugrupowania S-adenozylometioniny łańcucha RNA, w wyniku czego powstaje N6-metyladenozyna (m6a) [31]. Modyfikację tę umożliwia kompleks metylotransferaz zwanych „pisarzami”, taki jak kompleks METTL3/14 [32] i związane z nim frakcje, w tym WTAP [33], KIA1429 [34], RBM15 [35], ZCH13 [36,37] i METTL16 [38]. Nadmierna metylacja wiąże się z powiększonym wyciszeniem ekspresji genów, dlatego demetylasy określane jako „gumki” pozostają w ścisłej korelacji z kompleksem metylotransferazy [39]. Wśród nich wyróżnia się białko związane z otyłością (FTO) [40] i ALKBH5 [41,42]. Ostatnio opisanymi ważnymi miejscami regulacyjnymi powstawania m6a są białka wiążące zawierające domenę YTH [43] oraz podrodzina białek wiążących mRNA IGF2 [44]. Co ciekawe, nieprawidłowości w ekspresji genu METTL3, tzw. podjednostki m6a, wiążą się z wysoką śmiertelnością płodów i upośledzonym rozwojem oocytów. Ponadto, otyłość negatywnie wpływa na mikrośrodowisko pęcherzyków jajnikowych i samą komórkę

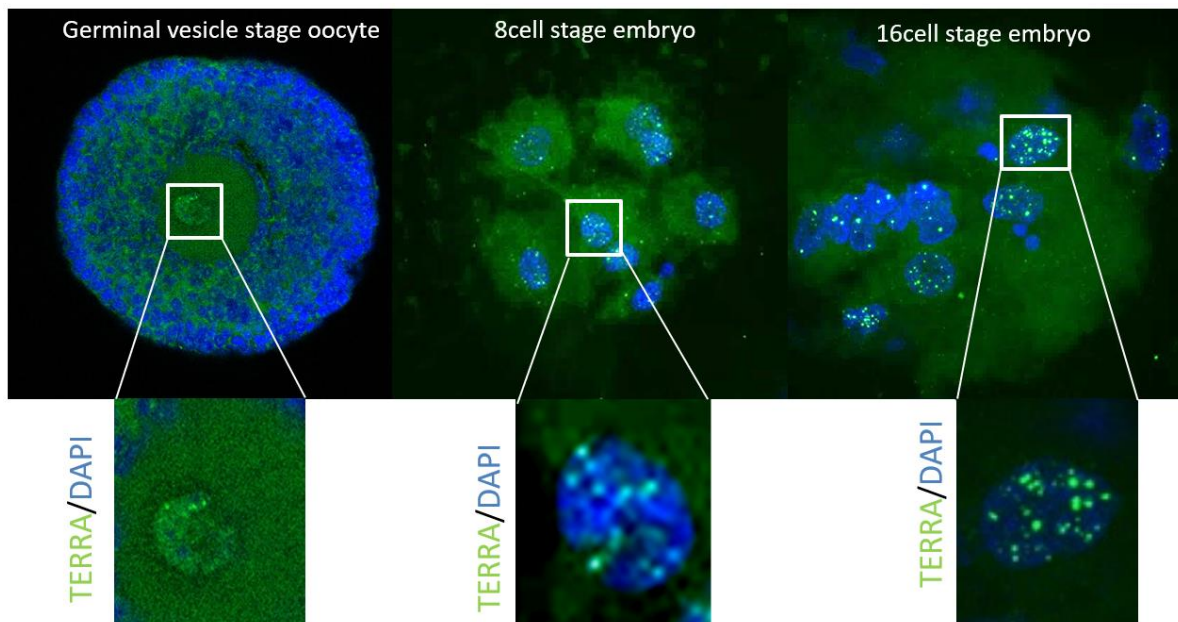
jajową poprzez niedobory energetyczne komórki jajowej lub dezorganizację i niewspółosiowość chromosomów [45-47]. Mechanizmami związanymi z otyłością, przez które zaburzona jest kompetencja rozwojowa oocytów, są na przykład: przewlekłe stany zapalne, stres oksydacyjny czy zaburzenia równowagi energetycznej. Kumulacja trójglicerydów w adipocytach prowadzi do ich hipertrofii i w konsekwencji martwicy, co stymuluje makrofagi i limfocyty T do produkcji cytokin prozapalnych tj. IL-1, IL-6 i TNF-alfa. Utajony przewlekły stan zapalny wpływa więc niekorzystnie na wszystkie tkanki organizmu, w tym na tkankę jajnika, a co za tym idzie na oocyty [48]. Ostatnie badania dostarczyły dowodów na to, że **sztywność tkanki jajnika** wydaje się ważna dla rozwoju, wzrostu i owulacji pęcherzyków u matek w podeszłym wieku [49]. Logiczną konsekwencją zdaje się to, że im starsza matka, tym mniejsze szanse na odpowiednią ekspansję pęcherzyka podczas dojrzewania ze względu na ograniczoną miękkość tkanki jajnika i tym mniejsze prawdopodobieństwo, że pęcherzyk pęknie podczas owulacji. Jednak szlaki molekularne i komórkowe odpowiedzialne za zwłóknienie jajników nadal nie są szeroko badane. Co ciekawe, podwyższoną akumulację kolagenu, odzwierciedlającą objawy związanego ze starzeniem zwłóknienia podścieliska, wykazano zarówno u ludzkich jajników po menopauzie [50], jak i u zwierząt w wieku rozrodczym [51]. Chociaż w innych narządach przyczyna zwłóknienia jest dobrze opisana, ścieżki prowadzące do zwłóknienia jajników pozostają nie w pełni wyjaśnione. Ponadto bez odpowiedzi pozostaje pytanie, czy istnieje korelacja między spadkiem płodności związanym ze starzeniem a zmieniającą się architekturą jajnika, co wymaga dalszego wyjaśnienia. Wydaje się prawdopodobne, że przewlekła akumulacja kolagenu w mikrośrodku jajnika wraz z postępującym wiekiem matki ogranicza prawidłowy proces owulacji. Faktem jest, że fizjologiczny proces owulacji wymaga przebudowy macierzy pozakomórkowej w taki sposób, aby pęknięty pęcherzyk jajnikowy

odpowiednio uwalniał komórkę jajową do jajowodu. Dlatego nie ma wątpliwości, że nadmiar kolagenu w jajniku, czyli **duża sztywność tkanki, działa jak bariera**. Innym ważnym czynnikiem, który wzbudził zainteresowanie naukowców zajmujących się starzeniem i medycyną reprodukcyjną, jest stres siateczki śródplazmatycznej (ER). Wspomniany stres prowadzi do nagromadzenia niesfałdowanych lub nieprawidłowo sfaldowanych białek w ER [52], a w konsekwencji do aktywacji specyficznej kaskady transdukcji sygnału, znanej również jako odpowiedź na niezfałdowane białka (unfolded protein response/UPR) [52]. Warto zauważyć, że stres ER jest aktywowany w oocytach, komórkach ziarnistych rosnących pęcherzyków oraz w zarodkach przed-implantacyjnych [52]. Ponadto stres ER negatywnie wpływa na steroidogenezę, a zatem zmniejsza jakość pęcherzyków jajnikowych i funkcję lutealną [52]. Co interesujące, umiarkowany stopień stresu ER w komórkach ziarnistych lub w komórkach wzgórka jajonośnego wydaje się korzystny dla dojrzewania oocytów [52]. Chociaż wiadomo, że stres ER jest związany z podwyższeniem poziomu cytokin prozapalnych i profibrotycznych w komórkach ziarnistych [53], nadal nie jest jasne, czy i w jaki sposób stres ER jest odpowiedzialny za zmiany w zrębie jajnika podczas starzenia [54,55].

4.5.4 Dynamika ekspresji TERRA w oocytach i we wczesnych stadiach podziału embrionalnego w zależności od wieku matczynego (Publikacja IV)

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykryto po raz pierwszy, że Telomeric Repeat-containing RNA (TERRA) występuje we wczesnym rozwoju zarodkowym bydła i myszy, a ponadto, że ekspresja TERRA jest dynamiczna w zależności od stadium zarodkowego. Znaczna ekspresja TERRA rozpoczyna się na etapie 4-komórkowego zarodka, osiągając maksimum ekspresji w stadium 16-komórkowego zarodka, po czym następuje spadek w stadium moruli i blastocysty (ryc. 4). Co ciekawe, wzrost wieku

dawczyni oocytów nie wpływa na ekspresję TERRA, podczas gdy ma to wpływ na długość telomerów we krwi dawczyń oocytów. Oznacza to, że ekspresja TERRA jest niezależna od długości telomerów we wczesnym rozwoju zarodkowym. Nasze odkrycia przewidują **istotną rolę TERRA we wczesnych stadiach rozwoju zarodkowym**, co może być przydatne w przyszłości, dla lepszego zrozumienia niepłodności związanej ze starzeniem u samic różnych gatunków ssaków i u kobiet. Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały po raz pierwszy ekspresję TERRA we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego u bydła i myszy. Ponadto, opracowałem bardzo sofistyczną metodę RNA-FISH w celu wykrywania TERRA we wczesnych zarodkach bydłowych i mysich. Co więcej, **moje wyniki zostały ocenione jako wysoce nowatorskie**, co zaowocowało wyborem moich zdjęć konfokalnych na okładkę czasopisma AGING w sierpniowym wydaniu 2020 roku (August 31,2020, V12N16). Godny podkreślenia jest także fakt, iż moja praca „Dynamics of telomeric repeat-containing RNA expression in early embryonic cleavage stages with regards to maternal age” została wybrana jako „**Priority Research Paper**”. Wyniki badań powstały podczas odbywanego przeze mnie stażu w grupie Pani prof. Maria Blasco z Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas (CNIO) w Madrycie. Co ciekawe, chociaż ogólnie przyjęto, że za dysfunkcję i skrócenie telomerów odpowiedzialnych jest kilka przyczyn środowiskowych, stres oksydacyjny (OS) wydaje się być najczęściej cytowanym mechanistycznym powodem wyżej wymienionego zjawiska. W nawiązaniu do publikacji I przedstawionego cyklu, warto zaznaczyć, że dysfunkcja mitochondriów stanowi jedno z możliwych wyjaśnień powstawania ROS z powodu braku mechanizmu obrony antyoksydacyjnej w komórce jajowej [56]. Dokładniej, ROS powstają jako produkt uboczny kilku reakcji, w których biorą udział enzymy, podobnie jak np. enzymy oksydazy NADPH [57]. Warto zauważyć, że neutralizacja ROS jest ważna nie tylko w



Rycina 4. Wizualizacja TERRA po zastosowaniu metody RNA-FISH.

Zdjęcia mikroskopu konfokalnego przedstawiające bydlęcego oocyty w stadium GV oraz bydlęcego 8-komórkowego i 16-komórkowego zarodka. Na zielono przedstawiono sygnał dla TERRA, oraz DAPI na niebiesko.

oocytach, ponieważ brak równowagi wywołany nadmierną produkcją ROS uszkadza DNA, lipidy i białka [58]. W ochronie lub zapobieganiu przed nadmiarem ROS, enzymy takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, odgrywają kluczową rolę, przekształcając O^{2-} w H_2O_2 . Co interesujące, badania populacyjne dostarczyły dowodów, że OS jest skorelowane z krótszymi średnimi długościami telomerów w białych krwinkach [59]. Począwszy od odkrycia telomerów do dziś, sugerowano różne teorie wyjaśniające, w jaki sposób OS wywołuje uszkodzenie i skracanie telomerowego DNA. Jednym z wyjaśnień jest to, że OS indukuje śmierć i/lub starzenie się komórki, a w konsekwencji w otaczających komórkach następuje przyspieszony podział komórek somatycznych jako mechanizm kompensacyjny, który prowadzi do skracania telomerów. Proces ten nie odzwierciedla jednak charakterystyki skracania i dysfunkcji telomerów w oocytach,

ponieważ po urodzeniu oocyty są komórkami niedzielącymi się [60], a aktywność telomerazy jest w znacznym stopniu stłumiona w tkankach somatycznych [61]. Warto zauważyć, że długość telomerów różni się w zależności od pochodzenia komórek somatycznych i pod względem ich aktywności replikacyjnej. Ilość podziałów komórkowych jest ograniczona do „Limitu Hayflicka”, przy której telomery stają się tak krótkie, że prowadzi to do starzenia się komórek i finalnie do śmierci komórki [61]. Według innego bardzo często dyskutowanego wyjaśnienia, ROS wyzwała (lokalnie w telomerach) pęknięcia pojedynczych nici (SSB) [62], a nawet prowokuje zapadnięcie się widełek replikacyjnych i utratę telomerów w komórkach somatycznych. Według Barnesa i wsp. wydaje się możliwe, że zmiany oksydacyjne wpływają również na transkrypcję TERRA w telomerach [56].

Badania dostarczyły dowodów na to, że ROS może wywoływać różne rodzaje uszkodzeń telomerycznego DNA [63], jednak ze względu na wysoką zawartość guaniny w tandemowych powtarzanych heksamerach, które są podatne na utlenianie, bardzo często powstaje 8-oksoguanina (8-oksoG) [64]. Co więcej, te telomeryczne heksamery są również podatnymi miejscami wiązania żelaza. Dlatego sugerowano, że reakcje biochemiczne, w których pośredniczy żelazo prowadzą do powstania rodników hydroksylowych, które z kolei powodują rozszczepienie na końcu 5' GGG [65]. Oprócz tworzenia 8-oxoG, badania dostarczyły dowodów na to, że ROS może reagować z pulami wolnych nukleotydów w nieaktywnych komórkach i co ciekawe, tak zwane utlenione trifosforany deoksynukleozydów (dNTP) wydają się mieć kluczowe znaczenie dla żywotności komórek i stabilności chromosomów [66]. Jednak nadal nie do końca wiadomo, w jaki sposób utlenione dNTP wpływają na utrzymanie i integralność telomerów dzięki plejotropowemu działaniu ROS i jak skutecznie naprawiane są oksydacyjne uszkodzenia telomerowego DNA [67]. Ostatnio pojawiły się doniesienia, że

przewlekłe pojawienie się 8-oxoG w telomerach indukuje skracanie telomerów [67], chociaż Abey i wsp. wykazali, że enzym peroksyredoksyna 1 występuje w dużych ilościach w telomerach podczas fazy S i jest w stanie chronić telomery przed uszkodzeniem oksydacyjnym [68]. Podsumowując, należy zaznaczyć jak ściśle związane ze sobą są **mitochondria i biologia telomerów**.

4.6 Podsumowanie i wnioski

Artykuły przedstawione w rozprawie habilitacyjnej **przyczyniły się znacznie** do poszerzenia dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmów warunkujących proces starzenia komórki jajowej oraz do opracowania nowych biomarkerów dla tego procesu. Tym samym są one **bardzo cenne zarówno dla dziedziny weterynarii**, jak i medycyny ludzkiej. Dokonania te potwierdzają i poszerzają również teorię tak zwanej „linii produkcyjnej”, wedle której najlepszej jakości oocyty to te, które zostaną uwolnione z pęcherzyków jako pierwsze, to znaczy w stosunkowo młodym wieku rozrodczym. Natomiast oocyty o obniżonej jakości owulują w bardziej zaawansowanym wieku, ze względu na ich chroniczną ekspozycję na bodźce środowiskowe. Obniżenie częstotliwości owulacji i ochrona młodzieńczych śladów epigenetycznych może stanowić nową strategię opóźniania skutków starzenia się oocytów. Daje to nadzieję na przyszłe interwencje przeciwdziałające negatywnym skutkom epigenetycznego starzenia się oocytów, szczególnie u samic w zawansowanym wieku rozrodczym. Ponadto wyniki badań prac oryginalnych przedstawione w rozprawie habilitacyjnej **przyczyniły się znacznie do poszerzenia dotychczasowej wiedzy** o stabilności telomerów oraz ekspresji TERRA, jak i na temat metylacji DNA w komórkach jajowych, mogących mieć znaczenie dla rozwoju zarodkowego i związaną z tym aberracją chromosomową. Badania przeprowadzone zostały przy wykorzystaniu modelu zwierzęcego: na

komórkach jajowych i zarodkach bydła oraz myszy. Za wykorzystaniem modelu krowy w badaniach biomedycznych nad rozrodem człowieka przemawiają m. in. analogie w przebiegu procesu rekrutacji pęcherzyków jajnikowych, rozwoju zarodkowego oraz zbliżona długość ciąży. Dane dotyczące zegara epigenetycznego, opisanego po raz pierwszy w naszych badaniach, mogą być odnoszone do komórek jajowych kobiet, ze względu na uzyskany, wysoki stopień korelacji pomiędzy gatunkiem bydlęcym a tkankami człowieka. Adekwatna modulacja mediów do dojrzewania oocytów *in vitro* lub suplementacja żywieniowa samic umożliwiłyby poprawę wieku epigenetycznego i tym samym powiększenie odsetka dobrej jakości oocytów w metafazie II oraz poprawę odsetka blastocyst. Mogłoby to posłużyć zwiększeniu skuteczności interwencji klinicznych/ weterynaryjnych, jakimi są techniki wspomaganego rozrodu, a także **powiększeniu liczby zwierząt długowiecznych do hodowli**, z wytrwałą funkcją narządów rodnych oraz wydajności. Znalezienie biomarkerów odzwierciedlających rzeczywisty wiek biologiczny komórki jajowej jest **niezwykle istotne**, gdyż wykorzystywane obecnie markery hormonalne skojarzone z wiekiem dawczyni, dostarczają jedynie informacji o wielkości rezerwy jajnikowej. Ponadto, otwierałoby to możliwość opracowania nowych terapii pozwalających na zniwelowanie zmian związanych z wiekiem i uzyskanie dobrej jakości komórek jajowych w starzejących się jajnikach w celu dłuższego **zachowania płodności**. Podsumowując, poznanie mechanizmów molekularnych zachodzących w oocytach pod wpływem starzenia, mikrośrodowiska, otyłości i metylacji DNA pozwoli na wdrożenie odpowiednich interwencji, które będą w stanie zredukować negatywne skutki wyżej wymienionych czynników. Ponadto w mojej rozprawie habilitacyjnej starałem się połączyć najnowsze odkrycia tych czynników, które są głównie dokonywane na modelach zwierzęcych i podkreślić ich znaczenie dla oocytu ssaków. Odpowiedź na pytanie w jakim stopniu te odkrycia są translacyjne dla ludzkiego oocytu,

wymaga dalszego wyjaśnienia. Jednak wyniki otrzymane w badaniach na zwierzętach mogą być pierwszą wskazówką do zidentyfikowania interwencji terapeutycznych w celu poprawy zdrowia oocytów. Siła epigenetyki podłożyła kamień węgielny pod **nową erę badań w medycynie weterynaryjnej** oraz otworzyła nowe możliwości rozszyfrowania molekularnych kodów długowieczności oocytów.

4.7 Bibliografia

1. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol.* 2018 Jul;20(7):745-754. doi: 10.1038/s41556-018-0124-1. Epub 2018 Jun 27. PMID: 29950572; PMCID: PMC6541229.
2. Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol.* 2007; 77:21–49. doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77002-8
3. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1076-80. doi: 10.1126/science.1164097. PMID: 19461003; PMCID: PMC2746744.
4. Lee JV, Carrer A, Shah S, Snyder NW, Wei S, Venneti S, Worth AJ, Yuan ZF, Lim HW, Liu S, Jackson E, Aiello NM, Haas NB, Rebbeck TR, Judkins A, Won KJ, Chodosh LA, Garcia BA, Stanger BZ, Feldman MD, Blair IA, Wellen KE. Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell histone acetylation. *Cell Metab.* 2014 Aug 5;20(2):306-319. doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.004. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24998913; PMCID: PMC4151270.
5. Menzies KJ, Zhang H, Katsyuba E, Auwerx J. Protein acetylation in metabolism - metabolites and cofactors. *Nat Rev Endocrinol.* 2016 Jan;12(1):43-60. doi: 10.1038/nrendo.2015.181. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26503676.
6. Teperino R, Schoonjans K & Auwerx J (2010) Histone methyl transferases and demethylases; Can they link metabolism and transcription? *Cell Metabolism* 12, 321–327.
7. Londoño Gentile T, Lu C, Lodato PM, Tse S, Olejniczak SH, Witte ES, Thompson CB, Wellen KE. DNMT1 is regulated by ATP-citrate lyase and maintains methylation patterns during adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2013 Oct;33(19):3864-78. doi: 10.1128/MCB.01495-12. Epub 2013 Jul 29. PMID: 23897429; PMCID: PMC3811875.

8. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Feb;21(2):85-100. doi: 10.1038/s41580-019-0173-8.
9. Shen Q, Liu Y, Li H, Zhang L. Effect of mitophagy in oocytes and granulosa cells on oocyte quality†. *Biol Reprod.* 2021 Feb 11;104(2):294-304. doi: 10.1093/biolre/ioaa194
10. Spikings EC, Alderson J, St John JC. Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biol Reprod.* 2007 Feb;76(2):327-35. doi: 10.1095/biolreprod.106.054536. Epub 2006 Oct 11. PMID: 17035641.
11. St John JC, Facucho-Oliveira J, Jiang Y, Kelly R, Salah R. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update.* 2010 Sep-Oct;16(5):488-509. doi: 10.1093/humupd/dmq002. PMID: 20231166.
12. Van Blerkom J, Davis P, Thalhammer V. Regulation of mitochondrial polarity in mouse and human oocytes: the influence of cumulus derived nitric oxide. *Mol Hum Reprod.* 2008 Aug;14(8):431-44. doi: 10.1093/molehr/gan037. Epub 2008 Jun 30. PMID: 18591214.
13. Allen JF, de Paula WB. Mitochondrial genome function and maternal inheritance. *Biochem Soc Trans.* 2013 Oct;41(5):1298-304. doi: 10.1042/BST20130106. PMID: 24059523.
14. de Paula WB, Lucas CH, Agip AN, Vizcay-Barrena G, Allen JF. Energy, ageing, fidelity and sex: oocyte mitochondrial DNA as a protected genetic template. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013 Jun 10;368(1622):20120263. doi: 10.1098/rstb.2012.0263. PMID: 23754815; PMCID: PMC3685464.
15. Bentov Y, Yavorska T, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Sep;28(9):773-83. doi: 10.1007/s10815-011-9588-7. Epub 2011 May 27. PMID: 21617930; PMCID: PMC3169682.
16. Marshall KL, Rivera RM. The effects of superovulation and reproductive aging on the epigenome of the oocyte and embryo. *Mol Reprod Dev.* 2018;85(2):90-105. doi:10.1002/mrd.22951
17. Eriksen MB, Nielsen MF, Brusgaard K, et al. Genetic alterations within the DENND1A gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). *PLoS One.* 2013;8(9):e77186. Published 2013 Sep 27. doi:10.1371/journal.pone.0077186. PMID: 24086769
18. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14, R115 (2013). doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115; PMID: 24138928

19. Mastenbroek S, de Wert G, Adashi EY (2021). The Imperative of Responsible Innovation in Reproductive Medicine. *N Engl J Med*, 385(22):2096-2100.
20. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153:1194-217.
21. Horvath S, Haghani A, Macoretta N, Ablaeava J, Zoller JA, Li CZ, et al. (2022). DNA methylation clocks tick in naked mole rats but queens age more slowly than non breeders. *Nat Aging*, 2:46-59.
22. Gleicher N, Barad DH, Adashi EY (2020). Why is use of donor eggs not viewed as treatment failure? A call for improvements in treatments with autologous oocytes. *J Assist Reprod Genet*, 37:1583-1588.
23. Arneson A, Haghani A, Thompson MJ, Pellegrini M, Kwon SB, Vu H, et al. (2022). A mammalian methylation array for profiling methylation levels at conserved sequences. *Nat Commun*, 13:783.
24. Wasserzug-Pash P, Rothman R, Reich E, Zecharyahu L, Schonberger O, Weiss Y, et al. (2022). Loss of heterochromatin and retrotransposon silencing as determinants in oocyte aging. *Aging Cell*, 21:e13568.
25. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, et al. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol*, 9:64-71.
26. Du W, Dong Q, Zhang Z, Liu B, Zhou T, Xu RM, et al. (2019). Stella protein facilitates DNA demethylation by disrupting the chromatin association of the RING finger-type E3 ubiquitin ligase UHRF1. *J Biol Chem*, 294:8907-8917.
27. Han L, Ren C, Zhang J, Shu W, Wang Q (2019). Differential roles of Stella in the modulation of DNA methylation during oocyte and zygotic development. *Cell Disc*, 5:1-4.
28. Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, et al. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477:606-610.
29. Huang Y, Kim JK, Do DV, Lee C, Penfold CA, Zyllicz JJ, et al. (2017). Stella modulates transcriptional and endogenous retrovirus programs during maternal-to-zygotic transition. *Elife*, 6:e22345.
30. Han L, Ren C, Li L, Li X, Ge J, Wang H, (2018). Embryonic defects induced by maternal obesity in mice derive from Stella insufficiency in oocytes. *Nat Gen*, 50:432-442.
31. Heck AM, Wilusz CJ (2019). Small changes, big implications: the impact of m6A RNA methylation on gene expression in pluripotency and development. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech BBA-Gene Regul Mech*, 1862:194402.
32. Kan L, Grozhik AV, Vedanayagam J, Patil DP, Pang N, Lim KS, et al. (2017). The m6A pathway facilitates sex determination in *Drosophila*. *Nat Commun*, 8:1-16.

33. Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, et al. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 24:177-189.
34. Yue Y, Liu J, Cui X, Cao J, Luo G, Zhang Z, et al. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov*, 4:1-17.
35. Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson, C, Guttman M, et al. (2016). m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537:369-373.
36. Knuckles P, Lence T, Haussmann IU, Jacob D, Kreim N, Carl SH, et al. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6A machinery component Wtap/Fl (2) d. *Gen Develop*, 32:415-429.
37. Wen J, Lv R, Ma H, Shen H, He C, Wang J, et al. (2018). Zc3h13 regulates nuclear RNA m6A methylation and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell*, 69:1028-1038.
38. Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter OV, Xie Y, Tu B, al. (2017). The U6 snRNA m6A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention. *Cell*, 169:824-835.
39. Yang Y, Hsu PJ, Chen YS, Yang YG (2018). Dynamic transcriptomic m6A decoration: writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Res*, 28:616-624.
40. Jia G, Fu YE, Zhao XU, Dai Q, Zheng G, Yang Y, et al. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 7:885-887.
41. Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, et al. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 49:18-29.
42. Tang C, Klukovich R, Peng H, Wang Z, Yu T, Zhang Y, et al. (2018). ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proc Natl Acad Sci*, 115:325-333.
43. Shi R, Ying S, Li Y, Zhu L, Wang, X, Jin H (2021). Linking the YTH domain to cancer: the importance of YTH family proteins in epigenetics. *Cell Death Dis*, 12, 1-14.
44. Huang H, Weng H, Sun W, Qin X, Shi H, Wu H, et al (2018). Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol*, 20, 285-295.
45. Snider AP, Wood JR (2019). Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. *Reproduction*, 158(3), R79-R90.

46. Gonzalez MB, Robker RL, Rose RD (2022). Obesity and oocyte quality: significant implications for ART and emerging mechanistic insights. *Biology of Reproduction*, 106(2), 338-350.
47. Silvestris E, de Pergola G, Rosania R, Loverro G (2018). Obesity as disruptor of the female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16, 1-13.
48. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews immunology*, 11(2), 85-97.
49. Umehara T, Winstanley YE, Andreas E, Morimoto A, Williams EJ, Smith KM (2022). Female reproductive life span is extended by targeted removal of fibrotic collagen from the mouse ovary. *Sci Adv*, 8(24):eabn4564.
50. McCloskey CW, Cook DP, Kelly BS, Azzi F, Allen CH, Forsyth A, et al (2020). Metformin Abrogates Age-Associated Ovarian Fibrosis. *Clin Cancer Res*, 26(3):632-642.
51. Mara JN, Zhou LT, Larmore M, Johnson B, Ayiku R, Amargant F, et al (2020). Ovulation and ovarian wound healing are impaired with advanced reproductive age. *Aging (Albany NY)*, 12(10):9686-9713.
52. Harada M, Takahashi N, Azhary JM, Kunitomi C, Fujii T, Osuga Y (2021). Endoplasmic reticulum stress: a key regulator of the follicular microenvironment in the ovary. *Mol Hum Reprod*, 27(1):gaaa088.
53. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Nose E, Azhary JM, Koike H, et al (2017). Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep*, 7(1):10824.
54. Briley SM, Jasti S, McCracken JM, Hornick JE, Fegley B, Pritchard MT, et al (2016). Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. *Reproduction*, 152(3):245-260.
55. Amargant F, Manuel SL, Tu Q, Parkes WS, Rivas F, Zhou LT, et al (2020). Ovarian stiffness increases with age in the mammalian ovary and depends on collagen and hyaluronan matrices. *Aging Cell*, 19(11):e13259.
56. Barnes R., Fouquerel E., Opresko P.L. The Impact of Oxidative DNA Damage and Stress on Telomere Homeostasis. *Mech. Ageing Dev.* 2019;177:37–45. doi: 10.1016/j.mad.2018.03.013
57. Lambeth J.D., Neish A.S. Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2014;9:119–145. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104651.
58. Davies M.J. Protein Oxidation and Peroxidation. *Biochem. J.* 2016;473:805–825. doi: 10.1042/BJ20151227.

59. Reichert S., Stier A. Does Oxidative Stress Shorten Telomeres In Vivo? A Review. *Biol. Lett.* 2017;13:20170463. doi: 10.1098/rsbl.2017.0463.
60. von Zglinicki T. Oxidative Stress Shortens Telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 2002;27:339–344. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02110-2.
61. Daniali L., Benetos A., Susser E., Kark J.D., Labat C., Kimura M., Desai K.K., Granick M., Aviv A. Telomeres Shorten at Equivalent Rates in Somatic Tissues of Adults. *Nat. Commun.* 2013;4:1597. doi: 10.1038/ncomms2602.
62. Michelini F., Pitchiaya S., Vitelli V., Sharma S., Gioia U., Pessina F., Cabrini M., Wang Y., Capozzo I., Iannelli F., et al. Damage-Induced lncRNAs Control the DNA Damage Response through Interaction with DDRNAs at Individual Double-Strand Breaks. *Nat. Cell Biol.* 2017;19:1400–1411. doi: 10.1038/ncb3643.
63. Cadet J., Wagner J.R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5:a012559. doi: 10.1101/cshperspect.a012559.
64. Luo W., Muller J.G., Rachlin E.M., Burrows C.J. Characterization of Hydantoin Products from One-Electron Oxidation of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanosine in a Nucleoside Model. *Chem. Res. Toxicol.* 2001;14:927–938. doi: 10.1021/tx010072j.
65. Oikawa S., Tada-Oikawa S., Kawanishi S. Site-Specific DNA Damage at the GGG Sequence by UVA Involves Acceleration of Telomere Shortening† *Biochemistry.* 2001;40:4763–4768. doi: 10.1021/bi002721g.
66. Fouquerel E., Lormand J., Bose A., Lee H.-T., Kim G.S., Li J., Sobol R.W., Freudenthal B.D., Myong S., Opresko P.L. Oxidative Guanine Base Damage Regulates Human Telomerase Activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016;23:1092–1100. doi: 10.1038/nsmb.3319.
67. Fouquerel E., Barnes R., Uttam S., Watkins S., Bruchez M.P., Opresko P.L. Targeted and Persistent 8-Oxoguanine Base Damage at Telomeres Promotes Telomere Loss and Crisis. *Mol. Cell.* 2019;75:117–130.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.04.024.
68. Aeby E., Ahmed W., Redon S., Simanis V., Lingner J. Peroxiredoxin 1 Protects Telomeres from Oxidative Damage and Preserves Telomeric DNA for Extension by Telomerase. *Cell Rep.* 2016;17:3107–3114. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.0

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Ścieżka mojej dotychczasowej kariery naukowej przebiegała przez wiele wiodących jednostek naukowo-badawczych na świecie. Po uzyskaniu tytułu lekarza weterynarii na Freie Universitaet Berlin (**Niemcy**), rozpocząłem pięcioletnią europejską specjalizację z rozrodu zwierząt i biotechnologii rozrodu jako asystent naukowy i doktorant w klinice ginekologii, położnictwa i andrologii zwierząt na Justus Liebig Universitaet w Giessen (**Niemcy**). Po obligatoryjnym odbyciu rocznego „Internship” według regulaminu „European College for Animal Reproduction” (ECAR), od 2014 do 2019 byłem Rezydentem ECAR pod opieką Prof. Dagmar Waberski, m.in. w Friedrich-Loeffler Institut w Mariensee (**Niemcy**), w School of Medical Sciences na University of New South Wales (UNSW) w Sydney (**Australia**), oraz w National Cancer Research Centre (CNIO) w Madrycie (**Hiszpania**). W 2016 roku obroniłem doktorat na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej/ Freie Universitaet Berlin (**Niemcy**) z wyróżnieniem „*magna cum laude*”. Podczas mojej pracy w CNIO w Madrycie spotkałem Prof. Elizabeth Blackburn (<https://www.vet.umk.pl/?id=19011>), która otrzymała Nagrodę Nobla w 2009 roku za odkrycie telomerów i która zainspirowała mnie do prowadzenia dalszych badań nad telomerami w oocytach. Podczas stażu w grupie Pani Prof. Maria Blasco z CNIO po raz pierwszy udało się opisać ekspresję TERRA we wczesnym rozwoju embrionalnym na modelu bydłym oraz powstała druga w historii publikacja opisująca wpływ rapamycyny na długość telomerów w bydłych komórkach jajowych. Jako stypendysta “Carl-Duisberg Fellowship” pracowałem w grupie Dr. Lindsay Wu z School of Medical Sciences (UNSW) we współpracy z Prof. David Sinclair z Harvard Medical School (**USA**) w ramach projektu “Female reproductive health preservation by nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) and Sirtuin2 (SIRT2)”.

Dzięki mojej pracy jako członek w konsorcjum „DNA-Methylation”, którego liderem jest Prof. Steve Horvath, niemiecko-amerykański badacz procesu starzenia, genetyk i biostatystyk na Uniwersytecie Kalifornijskim (UCLA) w Los Angeles (**USA**) oraz w Altos Labs w Cambridge (**UK**) zostały napisane cztery publikacje (już dostępne na bioRxiv) dotyczące zegara epigenetycznego pochodzącego od ponad 200 gatunków ssaków. W nawiązaniu do tych wyników redaktor czasopisma naukowego Science, Jocelyn Kaiser, napisała następujący artykuł: (<https://www.science.org/content/article/chemical-switches-genes-may-help-explain-why-large-mammals-live-longer#%2EYW8tnT7J6yE%2Elinkedin>).

Obecnie wyżej wymienione prace oryginalne, w których jestem współautorem, znajdują się w drugiej turze recenzji w czasopismach **Nature Aging** oraz **Science**. Za wybitne osiągnięcie w mojej karierze zawodowej uznaję uzyskanie tytułu „Diplomate of European College for Animal Reproduction” (**Dipl. ECAR**/załącznik nr 3.5) w University of Liege (**Belgia**). Na podkreślenie zasługuje fakt, że do chwili obecnej jestem **pierwszym i jedynym naukowcem w Polsce**, który zdał dwudniowy egzamin końcowy i otrzymał to prestiżowe wyróżnienie od ECAR. Tytuł, który zdobyłem stanowi uprawnienie do nauczania nowych rezydentów z Polski i całej Europy. Jest również jednoznaczny ze wstąpieniem do **European Board of Veterinary Specialization** – organu odpowiedzialnego za wszystkie standardy specjalizacji weterynaryjnych w Europie. Co więcej, tytuł ten był szczególnie istotny dla rozwoju mojej kariery, ponieważ po jego uzyskaniu zaproponowano mi stanowisko Visiting Assistant Professor (załącznik 3.6) na Harvard Medical School w Bostonie (**USA**). W ramach współpracy z Prof. Sabine Kaessmeyer (Uniwersytet w Bern/Szwajcaria) opracowaliśmy wpływ wieku i rasy na ukrwienie naczyń włosowatych jajników bydła, na mitochondria jajników i długość telomerów w krwi (doi: 10.3390/cells10102661). Współpraca z Dr. Amin Hagahni (Altos Labs/**USA**) i z Dr. Michael Klutstein (Hebrew University/**Israel**) prowadziła do

powstania publikacji nr III, wchodzącej w osiągnięcia habilitacyjne. W chwili obecnej aktywnie współpracuję z Porf. Jalid Sehouli i Prof. Sylvia Mechsner z Uniwersytetu Medycznego Charite w Berlinie w celu wyjaśnienia korelacji pomiędzy endometriozą a rakiem jajnika. Aktywnie współpracuję z Dr. Melina Schuh (Max-Planck-Institute, Goettingen/**Niemcy**), a celem prowadzonych przez nas badań jest identyfikacja wpływu starzenia komórki jajowej na wytworzenie wrzeciona w mejozie I i II. We współpracy z Dr. Fabrizio d'Adda di Fagagna (The FIRC Institute of Molecular Oncology, Milano/**Włochy**) wybarwiam białka metodą immunohistochemyczną w tkankach jajnika pochodzących od myszy z knock outem TERC, oraz analizuję zdjęcia konfokalne. W ramach współpracy naukowej z Dr. d'Adda di Fagagna zostałem zaproszony do redagowania sekcji dot. układu rozrodczego w pracy przeglądowej pod tytułem „Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases.”, opublikowanej w **Nature Cell Biology**, co jest zaznaczone w „Acknowledgements”. Za wysoko punktowany projekt złożony do Panelu Marie Skłodowska-Curie Actions wraz z Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas (Madrid/**Hiszpania**) otrzymałem **„Seal of Excellence”** Komisji Europejskiej (załącznik 3.6). Ponadto w roku 2022 uzyskałem **stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wybitnych Młodych Naukowców**. Również w 2022 roku otrzymałem grant „Mobility IDUB” Uniwersytetu Mikołaja Kopernika na miesięczny pobyt w Harvard Medical School oraz grant „Debiuty IDUB” pod tytułem „Deciphering the pathogenesis of endometroid associated ovarian cancer in women”. Wybitnym osiągnięciem oraz wyróżnieniem dla mojej pracy naukowej, było zaproszenie Papieskiej Akademii dla Życia na konferencje w **Watykanie** pod tytułem „1st International Conference Ethics of Engineering Life” w 2022r, w celu przedstawienia moich badań na temat komórki jajowej w sesji Young Scientists (<https://www.youtube.com/watch?v=t6lbU5ZpCKQ>), oraz spotkanie Papieża Franciszka na

Audiencji (<https://www.biol.umk.pl/wiadomosci/?id=27338>).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

6.1 Osiągnięcia dydaktyczne i promotorskie

2020 - obecnie:

1. **Wykłady i ćwiczenia** z zakresu andrologii na V. roku studiów (kierunek: Weterynaria, UMK, Toruń)
2. **Wykłady i ćwiczenia** z zakresu rozrodu i neonatologii zwierząt oraz biotechnologie rozrodu na IV. roku studiów (kierunek: Weterynaria, UMK, Toruń)
3. **Wykłady** z zakresu fizjologii zwierząt na II. roku studiów (kierunek: Weterynaria, UMK, Toruń)
4. **Wykłady** z zakresu histologii i embriologii zwierząt na I. roku studiów (kierunek: Weterynaria, UMK, Toruń)

2013 - 2015:

Seminaria (Klinische Demonstration) i ćwiczenia z zakresu rozrodu zwierząt i biotechnologie rozrodu IV i V rok (kierunek: Weterynaria, Tieraerztliche Hochschule Hannover oraz Weterynaria, Justus-Liebig-Universitaet, Giessen, Niemcy)

2022- obecnie:

Promotor pomocniczy dwóch doktorantek szkoły doktorskiej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika oraz Academia Copernicana w Toruniu (mgr. Kornelia Krajnik oraz lek.wet. Klaudia Miętkiewska). Od 2019 roku jestem członkiem europejskiego organu specjalizacji w medycynie weterynaryjnej (European Board of Veterinary Specialization) i od 2022 roku jestem **opiekunem (supervisor)** dwóch Rezydentów specjalizacji europejskiej z rozrodu zwierząt (European College of Animal Reproduction/ECAR) pani dr Ana Amaral oraz dr Natlia Słowinska. W 2023 zostałem kandydatem do komisji egzaminacyjnej ECAR (na egzaminy w roku 2024 i 2025), która jest odpowiedzialna za przeprowadzanie corocznego dwu dniowego egzaminu z europejskiej specjalizacji rozrodu zwierząt. Od 2022 sprawowałem opiekę naukową nad pracami badawczymi realizowanymi przez studentów, należących do Studenckiego Koła Naukowego (SKN) z zakresu Buiatria "RES

RUMINATIAE” Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

6.2 Osiągnięcia organizacyjne i popularyzatorskie

Osiągnięcia organizacyjne:

2022: Komitet Organizacyjno-Programowy międzynarodowej konferencji "Endometritis as a Cause of Infertility in Domestic Animals" <http://www.endometritis.pan.olsztyn.pl/>

2019: Komitet Organizacyjno-Programowy międzynarodowej konferencji "Endometritis as a Cause of Infertility in Domestic Animals" <http://www.endometritis.pan.olsztyn.pl/>

2017: Komitet Organizacyjno-Programowy międzynarodowej konferencji "Endometritis as a Cause of Infertility in Domestic Animals" <http://www.endometritis.pan.olsztyn.pl/>

2014: Komitet Organizacyjny międzynarodowej konferencji „Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung“, Giessen

2012: Komitet Organizacyjny międzynarodowej konferencji „Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung“, Berlin

Działalność popularyzatorska:

2023: W ramach programu SPINAKER-Intensywne Międzynarodowe Programy Kształcenia przeprowadziłem wykłady oraz ćwiczenia praktyczne w języku angielskim dla studentów obcokrajowych.

2023: Wykład w języku angielskim dla studentów Międzynarodowego Stowarzyszenia Studentów Weterynarii (IVSA) z Holandii pt. "Assisted reproductive technologies in small and farm animals", Olsztyn, 2023

2022: Wykład w języku angielskim dla studentów Międzynarodowego Stowarzyszenia Studentów Weterynarii (IVSA) z Turcji pt. "Assisted reproductive technologies in farm animals", Toruń, 2023

2018: Europejska Noc Naukowców: „Fusion2night”, w ramach popularyzacji nauki wykonałem badania ultrasonograficzne pokazowe dla uczniów różnych klas.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

7.1 Wyróżnienia i nagrody

2023: „Advanced Teaching Skills” przez Harvard Medical School (załącznik 3.7).

2023: Laureat nagrody (2.miejsce) za najlepsze ustne wystąpienie na konferencji „3rd International Conference on Geriatrics and Internal Medicine-Senectus”, Olsztyn

- 2022:** Wyróżnienie indywidualne Rektora UMK za osiągnięcia naukowe w 2021 roku
- 2020-2022:** Dziesięć nagród Rektora UMK za wysoko punktowe publikacje
- 2020:** Zdjęcie okładkowe czasopisma Aging (<https://www.aging-us.com/issue/v12i16>)
- 2019:** Osobowość Roku 2019 (3. miejsce) w kategorii "Nauka" magazynu "Polska Times"
- 2019:** Otrzymanie certyfikatu "Seal of Excellence" od komisji Unii Europejskiej za wysoką ocenę projektu naukowego złożonego do Marie Skłodowska Curie Actions (załącznik 3.6)
- 2017:** Pierwsze miejsce za najlepszy wykład młodych naukowców na konferencji „International Embryo Transfer Society” w Austin/Texas
- 2016:** Drugie miejsce za najlepszy wykład młodych naukowców na konferencji „European Association for Embryo Transfer” w Barcelonie/Hiszpania
- 2016:** Nagroda dla młodego naukowca "Travel Grant" od World Association for Buiatrics w Dublinie/Irlandia, 2016

7.5 Otrzymane stypendia i granty

- 2022:** Grant Mobility IDUB Uniwersytetu Mikołaja Kopernika dla pobytu na Harvard Medical School (**37.800 PLN**)
- 2022:** Grant Debiuty IDUB Uniwersytetu Mikołaja Kopernika pod tytułem "Deciphering the pathogenesis of endometroid associated ovarian cancer in women" (**50.000 PLN**)
- 2022:** Stypendium Ministra Edukacji i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (**194 040 PLN**)
- 2020:** Zadanie Statutowe IRZiBŻ Polskiej Akademii Nauk: "Can telomeres, TERRA, and the epigenetic clock condition aging of oocytes: finding new markers of female oocyte quality. 2020-2021 (**115.000 €**)
- 2018:** Zadanie Statutowe IRZiBŻ Polskiej Akademii Nauk: "Effect of cow aging on the efficiency of in vitro embryo production: a preliminary studies", (**17.500 €**)
- 2018:** Stypendium "POST-DOC" od KNOW Consortium (**17.500 €**)
- 2016:** Grant od Hannover Graduate School for Veterinary Pathobiology, Neuroinfectiology and Translational Medicine (**4.000 €**)
- 2016:** Stypendium Carl-DuisbergInternational Fellowship of Bayer Foundation (**6.000 €**)
- 2015:** Grant od fundacji Jutta and Georg Bruns „Untersuchungen zu dem Einfluss der Gene H1FOO und SIRT1 auf die Entwicklungskompetenz in vitro gereifter präpuberaler und adulter boviner Oozyten" (**12.000 €**)

2015: Grant od Akademie für Tiergesundheit e.V. (500€)

2015: Grant od European Association for Embryo Transfer (500€)

7.2. Recenzje dla czasopism naukowych

Advances in Clinical and Experimental Medicine, IF: 1.736 (1 recenzja)

Aging, IF: 5.955 (18 recenzji)

Aging Cell, IF: 11.005 (1 recenzja)

Animals, IF: 3.231 (12 recenzji)

Antioxidants, IF: 7.675 (2 recenzje)

Applied Sciences, IF: 2.838 (2 recenzje)

Biomedicines, IF: 4.757 (2 recenzje)

Cells, IF: 7.666 (21 recenzji)

Fertility and Sterility, IF: 7.49 (1 recenzja)

Genes, IF: 4.141 (9 recenzji)

Geroscience, IF: 7.581 (1 recenzja)

International Journal of Molecular Sciences, IF: 6.208 (28 recenzji)

Journal of the American Aging Association, IF: 7.608 (1 recenzja)

Journal of Clinical Sciences, IF: 5.220 (1 recenzja)

Life, IF: 3.253 (2 recenzje)

Molecular Human Reproduction, IF: 4.518 (1 recenzja)

Mitochondrion, IF: 4.534 (1 recenzja)

Nature Aging, IF: N.N. (1 recenzja)

Nature Communications, IF: 17.694 (1 recenzja)

Scientific Reports, IF: 4.996 (8 recenzji)

Toxins, IF: 5.075 (1 recenzja)

7.2. Redaktor w czasopismach naukowych

Członek Editorial Board czasopisma **Scientific Reports**

Członek Editorial Board czasopisma **Aging Nature Partner Journal (NPJ)**

Członek Editorial Board czasopisma **Journal of Embryology & Developmental Biology**

Członek Editorial Board czasopisma **Journal Cell Biology** Science Publishing Group

Członek Editorial Board czasopisma **Journal Biology Insights**

Redaktor Gościnny specjalnego wydania "Genomic Studies in the Mammalian Reproductive Tract" w czasopiśmie **Genes**

Redaktor Gościnny specjalnego wydania " Molecular Basis of Mammalian Meiosis" w czasopiśmie **Genes**

Redaktor Gościnny specjalnego wydania "From Development to Death: Molecular Pathways inside the Oocyte" w czasopiśmie **Cells**

Redaktor Gościnny specjalnego wydania "In Honor of Elizabeth Blackburn's 75th Birthday: Celebrating the discovery of telomeres" w **International Journal of Molecular Sciences**

Redaktor Sekcji "The Importance of Telomeres in Oocyte Aging" w **Frontiers in Aging**

Członek w panelu doradczym czasopiśma **International Journal of Molecular Science**

7.11. Odbyte szkolenia:

Course: Theoretical training, "Current topics in animal biotechnology", Mariensee, Germany, October, 2014

Course: Theoretical training, "Alternative methods to animal testing I", Hannover, Germany October, 2014

Course: Theoretical training, "Alternative methods to animal testing II ", Hannover, Germany, November, 2014

Course: Theoretical training, Hannover, "Neurophysiology", Hannover, Germany, November, 2014

Course: Writing workshop, "Scientific English- papers workshop", Hannover, Germany, November, 2014

Course: Practical and theoretical training, "Pathology of endocrine organs and mammary gland", Hannover, Germany, November, 2014

Course: Theoretical training, "Pathogen-host-interaction", Hannover, Germany, November, 2014

Course: Theoretical training, "How to write a scientific paper", Hannover, Germany, November, 2014

Course: Theoretical training, "Infection Immunology I", Hannover, Germany, December, 2014

Course: Theoretical training, "Infection Immunology II", Hannover, Germany, December, 2014

Course: Theoretical training, "Repitition in biometry", Hannover, Germany, January, 2015

Course: Theoretical training, "Introduction into Molecular Biology", Hannover, Germany, January, 2015

Course: Theoretical training, "Alternative methods in animal testing III", Hannover, Germany, February, 2015

Course: Theoretical training, "Alternative methods in animal testing IV", Hannover, February, 2015

Course: Practical and theoretical training, "Toxicological Pathology- Endocrine system and mammary gland", February, 2015

Course: Practical and theoretical training, "In vitro susceptibility testing of bacteria", Mariensee, Germany, March, 2015

Course: Practical and theoretical training, "Sequence analysis and sequence submission to database", Mariensee, Germany, March, 2015

Course: Practical and theoretical training, "FELASA B course", Hannover, Germany, April, 2015

Course: Practical and theoretical training, "FELASA C course", Hannover, Germany, August, 2015

Course: Theoretical training, "Gene editing workshop of the DGfZ", Mariensee, Germany, December, 2015

Course: Theoretical training, "Advancing Teaching Skills", Harvard Medical School, June 2023

.....
(podpis wnioskodawcy)