

**AUTOREFERAT  
WRAZ Z OMÓWIENIEM POZOSTAŁYCH  
OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH**

**dr n. wet. Małgorzata Ochota**

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Załącznik 2**  
**AUTOREFERAT**

**1) Imię i nazwisko**

Małgorzata Ochota

**2) Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

2004 doktor nauk weterynaryjnych

2004 specjalista rozrodu zwierząt

1999 lekarz weterynarii

**3) Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

2009 – obecnie adiunkt, Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

2005 – 2009 lekarz weterynarii, Szpital Kliniczny, Wolverhampton, Wielka Brytania

2000 – 2004 studia doktoranckie, Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, AR we Wrocławiu (obecnie: Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu)

**4) 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. z 2016 r., poz. 1586).**

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą złożonego przeze mnie wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego jest jednotematyczny cykl publikacji pod zbiorczym tytułem: **”Badania nad optymalizacją wybranych metod hodowli i kriokonserwacji przedimplantacyjnych zarodków kota domowego (*Felis catus*)”**. Cykl ten obejmuje 5 oryginalnych, monotematycznych publikacji. Sumaryczny Impact Factor (IF) wg. Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania lub ostatnim dostępnym rokiem na liście wynosi: **7,513**, a suma punktów MNiSW (wg. listy czasopism z dnia 26.01.2017r.): **135**. Łączny Impact Factor pozostałych prac nie ujętych w cyklu wynosi: **22,455**, punktów MNiSW: **440** (zgodnie z analizą bibliometryczną sporządzoną przez Bibliotekę Główną UP we Wrocławiu – Załącznik 7, str. 70).

## Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Ochota M., Wojtasik B., Nizański W.: Total cell number and its allocation to trophectoderm and inner cell mass in *in vitro* obtained cats' blastocysts. *Reprod Dom Anim.* 2016;51(3):339-45 (**IF<sub>2016</sub> = 1,400, MNiSW<sub>2016</sub> = 25**).

*Wkład w autorstwo szacuję na 67%: opracowanie koncepcji i zaplanowanie badań, udział we wszystkich etapach doświadczenia, wykonanie analizy statystycznej, interpretacja wyników, przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu.*

2. Ochota M., Nizański W.: Time of early cleavage affects the developmental potential of feline preimplantation embryos *in vitro*. *Theriogenology.* 2017;89:26-31 (**IF<sub>2016</sub> = 1,986, MNiSW<sub>2016</sub> = 30**).

*Wkład w autorstwo szacuję na 80%: opracowanie koncepcji i zaplanowanie badań, zebranie materiału doświadczonego, udział we wszystkich etapach doświadczenia, opracowanie statystyczne wyników, interpretacja wyników, przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu.*

3. Ochota M., Pasieka A., Nizański W. Superoxide dismutase and taurine supplementation improves *in vitro* blastocyst yield from poor-quality feline oocytes. *Theriogenology* 2016;85:922–927 (**IF<sub>2016</sub> = 1,986, MNiSW<sub>2016</sub> = 30**).

*Wkład w autorstwo szacuję na 60%: opracowanie koncepcji i zaplanowanie badań, zebranie materiału i nadzór nad wykonaniem doświadczenia, przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu.*

4. Ochota M., Wojtasik B., Nizański W. Survival rate after vitrification of various stages of cats embryos and blastocyst with and without artificially collapsed blastocoels cavity. *Reprod Dom Anim* 2017;52(Supl 2):281-287 (**IF<sub>2016</sub> = 1,400, MNiSW<sub>2016</sub> = 25**).

*Wkład w autorstwo szacuję na 80%: opracowanie koncepcji i zaplanowanie badań, przeprowadzenie części doświadczeń, opracowanie statystyczne wyników, interpretacja wyników, przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu.*

5. Ochota M, Nizański W. Effect of vitrification on apoptotic changes in feline embryos. *Czech J Anim Sci* 2018;63(4):144-151 (**IF<sub>2016</sub> = 0,741, MNiSW<sub>2016</sub> = 25**).

*Wkład w autorstwo szacuję na 80%: opracowanie koncepcji i zaplanowanie badań, zebranie materiału doświadczonego, udział we wszystkich etapach doświadczenia, opracowanie statystyczne wyników, interpretacja wyników, przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu.*

## **Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:**

### **Badania nad optymalizacją wybranych metod hodowli i kriokonserwacji przedimplantacyjnych zarodków kota domowego (*Felis catus*)**

#### Wprowadzenie

Jednym z bardziej istotnych osiągnięć ostatnich lat jest szybki rozwój nauk biomedycznych, a w szczególności technik wspomaganego rozrodu. Nowo opracowane procedury biotechniczne budzą wielkie nadzieje, ale również liczne obawy i kontrowersje. W przypadku medycyny człowieka, niepokój związany jest z etycznym aspektem ich stosowania (Pawlikowski M., 2011). Dylematy moralno-etyczne nie dotyczą w tak dużym stopniu medycyny zwierząt, a mimo to zaawansowanie badań w dziedzinie wspomaganego rozrodu jest tu dużo mniejsze. Początkowo podstawowym czynnikiem ograniczającym ilość prowadzonych w tej dziedzinie badań była możliwość komercjalizacji uzyskanych wyników. Jednakże w ostatnich latach zaczęto dostrzegać potrzebę ochrony ginących gatunków i zachowania ich materiału genetycznego. Stąd od kilku lat duże zainteresowanie budzą biotechniki, które mogą przyczynić się bezpośrednio lub pośrednio do zachowania materiału genetycznego gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem (Swanson i Brown, 2004).

Właśnie takie okoliczności zaistniały w przypadku zwierząt kotowatych. Populacja dzikich kotowatych jest alarmująco niska, a wszyscy przedstawiciele rodziny Felidae znajdują się na liście gatunków zagrożonych. Jedyne wyjątkiem stanowi kot domowy (*Felis catus*) doskonale radzący sobie w otoczeniu człowieka. Wszelkie doświadczenia na zwierzętach dzikich są bardzo trudne do przeprowadzenia. Z tego względu kot domowy okazał się dobrym i łatwo osiągalnym modelem zwierzęcym. Udowodniono, że techniki opracowane na materiale pochodzącym od kota domowego można z powodzeniem zastosować u innych zwierząt z tej samej rodziny (np. tygrysów, kotów bengalskich, gepardów czy kotów stepowych) (Goodrowe i in., 1989, Pope i in., 1989, Donoghue i in., 1990, Donoghue i in., 1992). Warto też zauważyć, że z drugiej strony rosnąca populacja wartościowych pod względem hodowlanym kotów rasowych, zwiększa zainteresowanie hodowców technikami wspomaganego rozrodu, pozwalającymi na poprawę ich zdolności rozrodczych (Nizański i in., 2012). Niestety procedury biotechniczne są w praktyce stosowane dość rzadko i w sposób przypadkowy. Wynika to z faktu specyficznej regulacji neurohormonalnej u kotek oraz czysto technicznych trudności przy domacicznym transferze zarodków. Powyższe

problemy potęguje mała ilość dobrej jakości zarodków uzyskiwanych w warunkach *in vitro* co istotnie wpływa na uzyskiwane wyniki (Tsutsui T., 2006).

Pierwsze zabiegi sztucznej inseminacji u kotów przeprowadzono ponad 30 lat temu. Mimo to, dotychczas uzyskane wyniki dobitnie pokazują, że techniki pozaustrojowego dojrzwania oocytów (ang. IVM - *in vitro* maturation), ich zapłodnienia (ang. IVF - *in vitro* fertilization) oraz późniejszej hodowli zarodków (ang. IVC - *in vitro* culture,), a także kriokonserwacja pozyskanego materiału u zwierząt kotowatych nadal nie są optymalne. Przede wszystkim zaledwie około połowy oocytów dojrzewa w warunkach *in vitro*, a z uzyskanych zarodków tylko nieliczne osiągają ostatnie stadium rozwoju – blastocystę. Ponadto rozwój zarodków w warunkach *in vitro* jest opóźniony w porównaniu do zarodków rozwijających się w macicy, a odsetek implantacji i ciąży jest dużo niższy niż w warunkach naturalnych. Podobnie wyniki transferu zarodków nie są tak dobre jak w przypadku innych gatunków zwierząt hodowlanych. Problemy te wynikają z braku dogłębnej wiedzy na temat fizjologii rozrodu zarodkowego u kotowatych oraz dostatecznej ilości badań aplikacyjnych dotyczących technik wspomaganego rozrodu przeznaczonych wyłącznie dla tego gatunku zwierząt (Wood i Wildt, 1997, Pope i in., 2006).

Mimo znacznego postępu w zakresie biotechnik rozrodu w przypadku zwierząt kotowatych nadal istnieje wiele niewiadomych wymagających dalszych prac w tej dziedzinie. Obecnie prowadzone badania mają na celu dokładne poznanie poszczególnych etapów procedury *in vitro* u kotowatych, tj. pozyskiwania i konserwacji gamet, zapłodnienia pozaustrojowego, hodowli, transferu i konserwacji zarodków. Zakłada się, że pozwoli to na wypracowanie biotechnik gatunkowo specyficznych dla kota domowego, a w zamyśle również dzikich kotowatych. Docelowo zaś przyczyni się do ochrony zagrożonych wyginięciem dzikich kotowatych oraz stworzenia ich rezerwy genetycznej (Fayrer-Hosken, 2007).

Badania będące przedmiotem tego opracowania skupiły się zatem na możliwości zastosowania biotechnik opracowanych dla innych gatunków zwierząt i człowieka w pozaustrojowej hodowli i konserwacji zarodków kota domowego.

#### Opis prac stanowiących osiągnięcie naukowe

Celem przedstawionych poniżej prac badawczych była ocena wpływu procedur biotechnicznych na dynamikę rozwoju zarodków kocich. Badania dotyczyły następujących problemów badawczych:

1. Fizjologia rozwoju przedimplantacyjnych zarodków kota domowego w warunkach *in vitro*;

2. Wpływ modyfikacji systemu hodowli a dynamika rozwoju zarodków *in vitro*;
3. Analiza oddziaływania procesu kriokonserwacji na żywotność i dalsze zdolności rozwojowe przedimplantacyjnych zarodków kota domowego.

#### **Ad. 1. Fizjologia rozwoju przedimplantacyjnych zarodków kota domowego w warunkach *in vitro***

Nadrzędnym celem pozaustrojowej produkcji zarodków jest ich potencjalna szansa na transfer do biorczyni, rozwój ciąży i urodzenie się zdrowego potomstwa. Warto pamiętać, że jednym z najważniejszych czynników wpływających na rozwój prawidłowej ciąży jest jakość zarodka. Pierwszy etap prezentowanego osiągnięcia dotyczył badań nad blastocystami kota domowego uzyskiwanymi w całości na drodze pozaustrojowej. Stadium blastocysty jest ostatnim etapem rozwoju zarodka zachodzącym wewnątrz osłonki przejrzystej. W warunkach naturalnych zarodki w stadium blastocysty wykluwają się z osłonki przejrzystej i implantują w ścianie macicy. W przypadku pozaustrojowej hodowli zarodka blastocysta jest ostatnim etapem tejże hodowli. Takie zarodki muszą zostać przetransferowane do biorczyń lub poddane kriokonserwacji, gdyż przy obecnym stanie wiedzy nie jesteśmy w stanie zapewnić im w warunkach laboratoryjnych, odpowiedniego środowiska do dalszego rozwoju. Jakość pozyskiwanych *in vitro* blastocyst pozwala pośrednio ocenić warunki w jakich jest prowadzona hodowla, przydatność stosowanych pożywek oraz inwazyjność stosowanych technik manipulacji (Kovacic i Vlajsavljevic, 2012).

W dostępnej literaturze nie ma praktycznie informacji na temat cech morfologicznych blastocyst kota domowego. W przeciwieństwie do medycyny człowieka, gdzie już od roku 1999 funkcjonuje ujednolicony system morfologicznej oceny blastocyst (Gardner i Schoolcraft, 1999). Podstawowe cechy morfologiczne oceniane w blastocystach to wielkość jamy blastocysty oraz rozmieszczenie i wygląd komórek wężła zarodkowego (ang. ICM – inner cell mass) i trofoblastu (ang. TE – trophectoderm). Komórki embrioblastu decydują o wewnątrzmacicznym rozwoju zarodka, natomiast trofoblastu o rozwoju części płodowej łożyska. Morfologia blastocysty zależy od jej wieku (blastocysty wczesne lub późne) i kompetencji rozwojowych, gdyż do uformowania jamy blastocysta potrzebuje dużych ilości energii oraz zdolności wytwarzania trwałych wiązań pomiędzy komórkami trofoblastu. Jest to możliwe tylko w przypadku prawidłowo rozwiniętych i dojrzałych blastocyst. Blastocysty mogą być również poddawane specjalistycznym barwieniom w celu dokładnej identyfikacji komórek embrioblastu i trofoblastu. Ilość i wzajemny stosunek ICM i TE stanowi doskonały marker jakości i żywotności blastocysty, a pośrednio wnosi istotne informacje o warunkach w jakich była prowadzona hodowla.

Pozyskanie dobrej jakości blastocyst, zdolnych do dalszego rozwoju po transferze do biorczyni, jest podstawowym celem pozaustrojowej hodowli zarodków. Pierwsza z prezentowanych w tym cyklu prac dotyczyła właśnie wnikliwej analizy blastocyst kota domowego pozyskiwanych w warunkach *in vitro*. Pierwsze blastocysty obserwowałam już w 3., a ostatnie w 10. dniu hodowli *in vitro*. Całkowita ilość blastomerów w badanych blastocystach wahała się od 58 do 245. Najniższa obserwowana ilość blastomerów we wczesnych blastocystach wynosiła 58 – 62, co wskazuje, że blastulacja w zarodkach kota domowego, w przeciwieństwie do człowieka, zachodzi dopiero po 5. podziale mitotycznym. Natomiast wykluwanie się blastocyst, obserwowałam dopiero w zarodkach które miały powyżej 140 blastomerów, czyli po 7. podziale mitotycznym. Największą całkowitą liczbę komórek embrioblastu (ICM) stwierdziłam w blastocystach w 8 dniu hodowli. Zarodki te miały również najkorzystniejszy stosunek ICM do całkowitej liczby blastomerów. W warunkach *in vivo* zdolność blastocyst do przekształcenia się w prawidłowe zarodki zależy przede wszystkim od ilości i jakości komórek embrioblastu i trofoblastu. W przypadku zwierząt kotowatych niema dokładnych danych dotyczących czasów osiągnięcia przez zarodki kolejnych stadiów przedimplantacyjnego rozwoju, ani informacji na temat średniej ilości komórek jaką posiada zarodek danym okresie. Badania dostarczające informacji na temat prawidłowej fizjologii przedimplantacyjnego rozwoju zarodków kota domowego są istotne gdyż pozwalają na obiektywną ocenę jakości zarodka oraz dostarczają pośrednio informacji na temat warunków w jakich został on uzyskany. Stanowią również punkt wyjścia do badań porównawczych dla zarodków pozyskanych w innych badaniach lub innymi metodami. Szczegółowe wyniki zostały opublikowane w pracy pt. *Total cell number and its allocation to trophectoderm and inner cell mass in vitro obtained cats' blastocysts*. Ochota M., Wojtasik B., Nizański W. *Reprod Dom Anim*. 2016;51(3):339-345.

Kolejnym słabo poznanym zganieniem w przypadku zwierząt kotowatych jest zależność pomiędzy dynamiką rozwoju a jakością uzyskiwanych blastocyst w warunkach *in vitro*. W medycynie człowieka istnieją dwa podstawowe podejścia do transferu zarodków. W metodzie klasycznej do transferu kwalifikowane są dopiero blastocysty. Takie podejście pozwala na eliminację zarodków rozwijających się nieprawidłowo i degenerujących, gdyż nie osiągają one stadium blastocysty i są wcześniej usuwane z hodowli. Od niedawna coraz częściej próbuje się przenosić młodsze zarodki, wychodząc z założenia, że naturalne środowisko macicy może podnosić ich szanse na prawidłowy rozwój. Jednakże problem tym w przypadku stanowi brak jednoznacznego kryterium oceny, dającego gwarancję ich późniejszego rozwoju w warunkach *in vivo*. Ocena morfologiczna stosowana z powodzeniem w przypadku blastocyst, nie jest równie

efektywna dla zarodków małych, zawierających zaledwie kilka blastomerów. Niedawno w przypadku medycyny człowieka, zaczęto jako dodatkowy czynnik prognostyczny wprowadzać połączenie oceny morfologicznej zarodka, z czasem w jakim następują jego pierwszy i kolejne podziały (Montag i in., 2013). Takie podejście wymaga dokładnej znajomości etapów rozwoju zarodka w warunkach *in vitro*.

Jak dotąd w przypadku kota domowego nie przeprowadzono szczegółowej analizy rozwoju zarodkowego. Taka wiedza jest niezwykle istotna z punktu widzenia biotechnik rozrodu gdyż pozwala na wczesną klasyfikację zarodków o wysokim bądź niskim potencjale rozwojowym. Jedyne dostępne dane literaturowe porównują dynamikę rozwoju zarodków w warunkach *in vivo* i *in vitro* i ukazały się ponad trzydzieści lat temu (Roth i in., 1994). Nie dają one jednoznacznej odpowiedzi jak szybko u kotów dochodzi do pierwszych podziałów po zapłodnieniu. Autorzy stwierdzają jedynie, że w warunkach *in vitro* w 30 godz. po zapłodnieniu obserwowano 2-3- i 4-komórkowe zarodki, natomiast *in vivo* zygoty pozyskiwano w 60 godz. od naturalnego krycia. Z tego względu drugi problem badawczy prezentowany w niniejszym cyklu dotyczył szczegółowej oceny poszczególnych etapów rozwoju zarodków kota domowego w warunkach pozaustrojowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań jednoznacznie stwierdziłam, że bruzdkowanie oraz początkowe podziały mitotyczne w zarodkach kota domowego zachodzą stosunkowo szybko w porównaniu do innych gatunków ssaków. Większość badanych zarodków bruzdkowała już przed 24 godz. od rozpoczęcia zapłodnienia pozaustrojowego (ang. IVF - *in vitro* fertilization). Ponadto, wyniki tych badań potwierdziły występowanie bloku rozwojowego w zarodkach kota domowego na etapie moruli, czyli dużo później niż u innych ssaków. Uzyskane wyniki pokazały również, że czas bruzdkowania istotnie wpływał na potencjał rozwojowy zarodka. Najwięcej blastocyst uzyskano przypadku zarodków bruzdkujących bardzo wcześnie, przed 18 godz. od IVF. Co więcej żaden z badanych zarodków, u których stwierdzano pierwszy podział późno, powyżej 24 godz. od IVF, nie osiągnął stadium blastocysty, tylko ulegał zatrzymaniu i następnie degeneracji na wcześniejszych etapach rozwoju.

Te ostatnie informacje są niezwykle cenne z punktu widzenia technik wspomaganego rozrodu. Rozwój zarodka w warunkach *in vitro* jest poddawany szczegółowej ocenie. Najczęściej stosowaną, nieinwazyjną techniką oceny jest ocena oparta na cechach morfologicznych zarodka (symetryczność podziałów, wygląd blastomerów itp.). Jej zaletą jest bezpieczeństwo i mała inwazyjność w stosunku do rozwijającego się zarodka, a wadą fakt że nie zawsze precyzyjnie oddaje jego potencjał rozwojowy. W medycynie człowieka już od pewnego czasu zwraca się uwagę związek pomiędzy początkową dynamiką podziałów zarodkowych, a całkowitą zdolnością



rozwojową danego zarodka (Windt i in., 2004). Niestety, jak dotychczas przeprowadzono tylko jedną tego typu analizę dotyczącą zarodków pochodzących od kota domowego (Klincumhom i in., 2012). Stąd duże zapotrzebowanie na badania dotyczące korelacji pomiędzy momentem bruzdkowania i późniejszym potencjałem rozwojowym zarodka. Szczegółowe opracowanie tematu pozwala na prostą, szybką i bezpieczną ocenę szans zarodka na dalszy rozwój w warunkach hodowli *in vitro*, co jest niezmiernie istotne w przypadku decyzji o ewentualnym transferze lub kriokonserwacji danego zarodka. Szczegółowe wyniki dotyczące tego etapu badań zostały opublikowane w pracy pt. *Time of early cleavage affects the developmental potential of feline preimplantation embryos in vitro*. Ochota M, Nizański W. *Theriogenology*. 2017;89:26-31.

## **Ad. 2 Wpływ modyfikacji systemu hodowli a dynamika rozwoju zarodków *in vitro***

Zupełnie innym aspektem hodowli *in vitro* zarodków jest modyfikacja warunków hodowlanych mająca na celu poprawę uzyskiwanych wyników. Od początku techniki wspomaganego rozrodu ulegały zmianom i rozwojowi w oparciu o dane naukowe oraz praktyczne doświadczenia. Postęp ten jednak dotyczył głównie medycyny człowieka, zwierząt laboratoryjnych oraz zwierząt o znaczeniu komercyjnym. W przypadku zwierząt kotowatych najczęściej adaptuje się techniki wcześniej opracowane dla innych gatunków, co nie zawsze jest korzystne. Rosnące w ostatnich latach zainteresowanie ochroną ginących gatunków dzikich kotowatych przyczyniło się do wzmożonych badań nad optymalizacją warunków hodowlanych, która przyniosłaby poprawę uzyskiwanych wyników w dziedzinie biotechnik.

Najczęstszym problemem w pozaustrojowej hodowli zarodków kota domowego są bloki rozwojowe i/lub degeneracja poszczególnych blastomerów uniemożliwiająca dalszy rozwój całego zarodka. Podstawowe czynniki decydujące o powstaniu zarodka i jego dalszym rozwoju to warunki w jakich prowadzona jest hodowla oraz wyjściowa jakość pozyskanych do hodowli oocytów (Herrick i in. 2007). Oocyty klasyfikowane są na podstawie cech morfologicznych i wszystkie te, które nie spełniają ściśle wyznaczonych kryteriów, są eliminowane jeszcze przed rozpoczęciem hodowli. Prowadzi to do utraty dużej ilości materiału biologicznego, co jest niezwykle istotne w przypadku gatunków zagrożonych, gdzie szanse na pozyskanie dużej ilości komórek są znikome. W związku z tym, kolejne prezentowane w cyklu badania dotyczyły sprawdzenia czy modyfikacja warunków hodowlanych pozwoli oocytom, dotychczas usuwanym z hodowli, na prawidłowy rozwój i osiągnięcie stadium blastocysty (Wood i Wildt, 1997).

Powodzenie pozaustrojowego dojrzewania komórek jajowych (IVM) oraz hodowli zarodków (IVC) zależy między innymi od jakości i ilości pozyskanych oocytów. Do dalszych procedur biotechnicznych, wybiera się oocyty na podstawie cech morfologicznych

samych komórek jajowych oraz komórek wieńca promienistego. U samic kota domowego zwykle nie stosuje się stymulacji hormonalnej, więc uzyskane oocyty różnią się znacząco między sobą jakością i stopniem dojrzałości, a co za tym idzie przydatnością do dalszych procedur biotechnicznych. Niestety czasem nawet ok. 85% pozyskanych oocytów, w ocenie morfologicznej jest dyskwalifikowana jako nieprzydatna do dalszej hodowli *in vitro* (Wood i Wildt, 1997). Biorąc pod uwagę powyższe ograniczenia celem kolejnego z doświadczeń było sprawdzenie czy dodatek antyoksydantów podczas dojrzewania oocytów i hodowli zarodków poniesie ilość uzyskiwanych blastocyst. Dodatek substancji przeciwutleniających do pożywek hodowlanych był stosowany wcześniej u zwierząt laboratoryjnych, świń i królików i poprawiał istotnie wyniki hodowli *in vitro* (Li i in., 1993, Chun i in., 1994, Suzuki i Yoshioka, 2006). Schemat doświadczenia opierał się na wzbogaceniu pożywki hodowlanej przeznaczonej do dojrzewania oocytów oraz hodowli zarodków o dysmutazę ponadtlenkową (ang. SOD – superoxide dismutase) oraz taurynę, odpowiednio w ilości 600 UI/mL i 10 mmoli. Oba te związki mają silne działanie antyoksydacyjne, a także są fizjologicznymi składnikami płynu jajowodowego, odgrywając rolę w dojrzewaniu komórek jajowych i rozwoju zarodków *in vivo*. Dojrzewanie oocytów i hodowla zarodków w laboratorium jest zawsze prowadzone w warunkach suboptymalnych. Co sprzyja tworzeniu się większej ilości wolnych rodników, których naturalne mechanizmy antyoksydacyjne obecne w oocytach i komórkach wieńca promienistego, mogą nie być w stanie zneutralizować, co w efekcie może prowadzić do degeneracji oocytów czy zamierania zarodków (Takahashi M., 2012).

W przeprowadzonym doświadczeniu do hodowli kwalifikowano nie tylko pulę najlepszych oocytów, ale również te o gorszych parametrach morfologicznych, które zwykle są eliminowane z dalszej hodowli. Uzyskane wyniki okazały się dość zaskakujące. Dodatek antyoksydantów nie był korzystny w przypadku dobrej jakości oocytów, natomiast zdecydowanie poprawiał dojrzewanie oocytów (IVM) oraz ilość i jakość blastocyst uzyskiwanych z oocytów gorszej jakości w warunkach *in vitro*. Prawdopodobnie wynikało to z fizjologicznej wydajności mechanizmów antyoksydacyjnych oocyty czy zarodka, które muszą być znacząco upośledzone w przypadku komórek jajowych gorszej jakości. Stąd dodatek substancji antyoksydacyjnych hamował postęp procesów oksydacyjnych pozwalając na dalszy prawidłowy rozwój takich oocytów, a później zarodków. Doświadczenie to stanowiło temat pracy magisterskiej przeprowadzonej pod moim kierunkiem (Anna Pasieka: „Wpływ dodatku antyoksydantów na dojrzewanie i rozwój zarodków kota domowego (*Felis catus*)”), ponadto otrzymane wyniki zostały opublikowane w pracy pt. *Superoxide dismutase and taurine supplementation improves in vitro blastocyst yield from poor-quality feline oocytes*. Ochota M., Pasieka A., Niżański W. *Theriogenology* 2016;85:922–927.

### **Ad. 3 Analiza oddziaływania procesu kriokonserwacji na żywotność i dalsze zdolności rozwojowe przedimplantacyjnych zarodków kota domowego**

W przypadku technik wspomaganego rozrodu często trudno o dobrą synchronizację pomiędzy pozaustrojową produkcją zarodków, a przygotowaniem do ich przyjęcia układu rozrodczego biorczyni. Z drugiej strony nie zawsze nadrzędnym celem jest transfer uzyskanych zarodków, czasem istotniejsze jest odwracalne zatrzymanie procesów metabolicznych i umiejętność bezpiecznego przechowywania materiału genetycznego bez utraty jego funkcji biologicznych. Jak dotąd najlepszą znaną metodą konserwacji jest przechowywanie komórek czy tkanek w ekstremalnie niskich temperaturach (Luvoni, GC., 2006). Schładzanie materiału biologicznego do temperatury ciekłego azotu (-196 °C) może odbywać się na drodze powolnego mrożenia lub ultra szybkiego czyli witrifikacji. Tempo procesu mrożenia ma ogromny wpływ na zmiany zachodzące w komórkach. W przypadku powolnego mrożenia największe niebezpieczeństwo stanowi tworzenie się kryształów lodu, które mechanicznie mogą uszkadzać zamrażany materiał lub krystalizacja wody może prowadzić do zaburzeń równowagi osmotycznej. Problemy te omija się w przypadku coraz popularniejszej witrifikacji, podczas której dochodzi do tzw. zeszklenia, czyli przejścia roztworów komórkowych z postaci cieczy w bezpostaciowy stan przypominający swoją strukturą szkło, pominięciem etapu tworzenia się kryształów lodu. Witrifikacja czyli ultra szybkie mrożenie jest nowszą metodą, znajdującą coraz powszechniejsze zastosowanie w praktyce, ze względu na swoją prostotę i szybkość wykonania (Kader i in., 2009). Ponadto metoda ta nie wymaga użycia specjalistycznego sprzętu i jest szybka i tania. Z tego względu może być ona szczególnie przydatna w warunkach terenowych, czy też w przypadkach nagłych padnięć cennych genetycznie zwierząt, pozwalając na skuteczną konserwację ich materiału genetycznego. Jedyne ograniczenie stanowi konieczność użycia wysokich stężeń substancji krioprotekcyjnych, które mogą być toksyczne dla witrifikowanych komórek. Zarówno procedura witrifikacji jak i stężenia krioprotektantów, żeby były skuteczne, wymagają odrębnego podejścia gatunkowego (Saragusty i Arav, 2011).

Jak dotąd udało się zamrozić zarodki ok. 40 gatunków (w tym człowieka i zwierząt laboratoryjnych) (Saragusty i Arav, 2011). Pomimo stosowania różnych technik oraz poddawania kriokonserwacji zarodków w różnym wieku nie udało się określić prostej zależności pomiędzy stopniem rozwoju zarodka, a jego podatnością na mrożenie. Zarodki różnią się wielkością i budową między sobą, co wpływa to istotnie na możliwość ich potencjalnego uszkodzenia podczas procesu mrożenia i ogrzewania. U zwierząt kotowatych jak dotąd przeprowadzono nieliczne próby witrifikacji zarodków i blastocyst, z zastosowaniem technik witrifikacji i mieszanin

krioprotekcyjnych adaptowanych od innych gatunków zwierząt (Tsujioka i in., 2008, Pederson i in., 2009).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach na początku przeprowadziłam doświadczenia wstępne mające na celu opracowanie gatunkowo specyficznej procedury witrifikacji i składu mieszanin kriochronnych przeznaczonych wyłącznie dla zarodków kota domowego (Ochota i in., 2014). Różne substancje kriochronne i czasy inkubacji podczas procedury witrifikacji były aplikowane dla zarodków kota domowego z pominięciem procesu mrożenia, aby wykluczyć wpływ niskich temperatur na uzyskane wyniki. Badane roztwory witrifikacyjne zawierały odpowiednio: rosnące stężenia dimetylosulfotlenku (DMSO), glikolu etylenowego (EG) lub propylenowego (PrOH), sacharozy lub trechalozy i Ficollu. Doświadczenie składało się z trzech etapów: 1. Ocena krystalizacji roztworów witrifikacyjnych w temperaturze – 196° C i - 80° C; 2. Zmiany objętości zarodków w roztworach witrifikacyjnych w celu określenia czasu ich ekwilibracji; 3. Sprawdzenie toksyczności badanych roztworów dla zarodków, bez poddawania ich szybkiemu mrożeniu. Analiza wyników pozwoliła na określenie najniższych skutecznych i bezpiecznych stężeń krioprotrenktantów oraz efektywnych czasów ekwilibracji, witrifikacji i ogrzewania. Badania wstępne pozwoliły na opracowanie indywidualnego protokołu witrifikacji przeznaczonego dla zarodków kota domowego, który był stosowany w dalszych etapach badań.

W kolejnej części doświadczenia oceniałam bezpieczeństwo procesu witrifikacji w zależności od stadium rozwojowego zarodka oraz wpływ modyfikacji samej techniki na żywotność zarodków po ogrzaniu. Witrifikacji były poddawane różne stadia rozwojowe zarodków oraz blastocysty. W przypadku blastocyst dodatkowo stosowano modyfikację techniki witrifikacji polegającą na mechanicznej redukcji objętości jamy blastocysty. Płyn zawarty w jamie blastocysty może mieć niekorzystny wpływ na procedurę kriokonserwacji. Mechaniczne usunięcie tego płynu wykonywano poprzez nakłucie osłonki przejrzystej mikropipetą pod kontrolą wzroku, z użyciem mikromanipulatora, a następnie pozostawiano blastocystę na 10 min celem pełnego obkurczenia blastocoele. Dopiero taka blastocysta była poddawana witrifikacji. Okazało się, że technika ta znacząco poprawiała porozmrożeniową żywotność blastocyst. Uzyskane w tym etapie wyniki pokazały również, że najlepiej proces witrifikacji-ogrzewania przeżywały zarodki 4 – 16 blastomerowe i wczesne blastocysty. Szczegółowe wyniki tych doświadczeń zostały opublikowane w artykule pt. *Survival rate after vitrification of various stages of cats embryos and blastocyst with and without artificially collapsed blastocoels cavity. Ochota M., Wojtasik B., Niżański W. Reprod Dom Anim 2017;52(Supl. 2):281-287.*

Uważa się, że jedną z przyczyn zamierania zarodków podczas procesu kriokonserwacji jest nasilenie się procesów apoptotycznych. W prawidłowo rozwijających się zarodkach niektóre blastomery podlegają apoptozie i jest to fizjologiczny proces mający na celu regulować właściwy rozwój zarodka i eliminować nieprawidłowe komórki (Hardy, 1999). Niestety podczas zamrażania zarodków zarówno niska temperatura jak i skład stosowanych roztworów krioprotekcyjnych mogą mieć niekorzystny wpływ na poszczególne blastomery, a co za tym idzie negatywnie korelować z przeżywalnością całego zarodka. Aby to zbadać ostatni etap prowadzonych badań dotyczył nasilenia procesów apoptotycznych w zarodkach kota domowego poddanych działaniu niskich temperatur podczas procesu witrifikacji.

Apoptoza czyli programowana śmierć komórki polega na uruchomieniu się wewnątrzkomórkowych procesów prowadzących do wystąpienia zmian morfologicznych prowadzących do śmierci komórki. Apoptoza jest uważana za proces fizjologiczny pozwalający na zachowanie równowagi między pojawianiem się nowych komórek, a ich umieraniem (Makarevich AV., 2008). Zachodzi ona również w blastocystach regulując ilość komórek trofoblastu i embrioblastu i umożliwiając eliminację nieprawidłowych blastomerów. Jednakże, jeżeli w zarodku ilość komórek podlegających procesom apoptotycznym przekroczy określony poziom, dojdzie do zaburzeń homeostazy, co może spowodować śmierć całego zarodka (Betts i King, 2001). Udowodniono, że w przypadku zarodków rozwijających się w warunkach *in vitro* nasilenie procesów apoptotycznych wzrasta ze względu na suboptymalne środowisko hodowlane oraz stosowane manipulacje biotechniczne (Fabian D., 2005). Niestety część tych niekorzystnych czynników jest nie do uniknięcia, a jeżeli chodzi o pozostałe, to próbuje się lokalizować ich źródła i w miarę możliwości modulować ich wpływ na hodowlę. Proces kriokonserwacji jest z założenia stwarza wysoce stresogenne warunki, które sprzyjają występowaniu negatywnych procesów komórkowych. Mimo tego, z punktu widzenia biotechnik rozrodu jest on kluczowy, gdyż umożliwia przechowywanie materiału genetycznego przez dłuższy okres czasu. W związku z tym badania skupiają się przede wszystkim na identyfikacji najbardziej zagrażających żywym komórkom etapów procesu kriokonserwacji, z nadzieją na ich modyfikację i w efekcie poprawę uzyskiwanych wyników.

Istnieją dwie podstawowe metody wykrywania procesów apoptotycznych. Barwienie z użyciem Annexyny V do wykrywania wczesnych zmian apoptotycznych polegających na przesunięciu fosfatydylocholino oraz test TUNEL wykrywający uszkodzenia nici DNA, do których dochodzi na dalszych etapach procesu programowanej śmierci komórki. Oba te testy zostały użyte w ostatnim, z prezentowanych w tym opracowaniu, doświadczeń. Celem była ocena wpływu procesu kriokonserwacji na występowanie i nasilenie procesów apoptotycznych

i ich korelacja z porozmrożeniową żywotnością zarodków. Okazało się, że przy zastosowaniu wcześniej opracowanego protokołu witrifikacji większość zarodków (84,3%) przeżywała proces witrifikacji-ogrzewania i była zdolna do dalszych podziałów. Podobnie było w przypadku zarodków w stadium blastocysty, ponad połowa (55,6%) okazała się żywa po ogrzaniu. Przy czym proces witrifikacji-ogrzewania istotnie podniósł odsetek apoptotycznych blastomerów w porównaniu do nie poddawanej działaniu niskich temperatur grupy kontrolnej. Co ciekawe zwiększyła się tylko grupa blastomerów późnoapoptotycznych, co nasuwa przypuszczenie, że konserwacja w niskich temperaturach powoduje progresję zapoczątkowanych wcześniej procesów apoptotycznych, ale nie inicjuje nowych. Uzyskanie znacznego odsetka żywych zarodków i blastocyst pozwala założyć, że technika witrifikacji ogrzewania jest efektywna i bezpieczna, a utrata niektórych z blastomerów nie jest decydująca dla dalszych zdolności rozwojowych zarodka. Szczegółowe wyniki tego etapu badań zostały przedstawione w pracy pt. *Effect of vitrification on apoptotic changes in feline embryos*. Ochota M, Nizański W. *Czech J Anim Sci* 2018;63(4):144-151.

Analizując prace badawcze, stanowiące podstawę cyklu publikacji przedstawianych w ramach szczególnego osiągnięcia naukowego, chcę podkreślić nowatorskie ujęcie tematu, oryginalność otrzymanych rezultatów oraz możliwość ich praktycznego wykorzystania. Ponadto, pracowanie uzyskanych wyników pozwoliło na:

1. Szczegółowe poznanie etapów rozwoju zarodków kota domowego w warunkach *in vitro* oraz morfologii blastocyst, co jak dotychczas nie zostało opisane w literaturze;
2. Ocenę wpływu modyfikacji składu pożywek hodowlanych na dojrzewanie oocytów i rozwój zarodków oraz technik mikromanipulacji na bezpieczeństwo procesu kriokonserwacji;
3. Opracowanie gatunkowo specyficznego protokołu witrifikacji-ogrzewania przeznaczonego dla zarodków i blastocyst kota domowego;
4. Analizę proapoptotycznego działania niskich temperatur podczas kriokonserwacji zarodków kota domowego

Piśmiennictwo:

- Betts D.H., King W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. 2001;1:171–191.
- Chun Y.S., Lim J.H., Lee H.T., Chung K.S. Effect of superoxide dismutase on the development of preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*. 1994;4:511–20.
- Donoghue A.M., Howard J.G., Byers A.P., Goodrowe K.L., Bush M., Blumer E., Lukas J., Stover J., Snodgrass K., Wildt D.E. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization *in vitro* in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Biol Reprod*. 1992;46:1047–56.

- Donoghue A.M., Johnston L.A., Seal U.S., Armstrong D.L., Tilson R.L., Wolff P., Petrini K., Simmons L.G., Gross T., Wildt D.E. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod.* 1990;43:733–44.
- Fabian D., Koppel J., Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology.* 2005;64:221–231.
- Fayrer-Hosken R. Embryo transfer in the dog and cat. *Theriogenology.* 2007;68(3):382-5. Gardner D.K., Schoolcraft M.D. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D (eds), *Toward Reproductive Certainty: Fertility And Genetics Beyond.* Parthenon Publishing, Carnforth, UK, 1999:378–388.
- Goodrowe K.L., Miller A.M., Wildt D.E. In vitro fertilization of gonadotropin-stimulated leopard cat (*Felis bengalensis*) follicular oocytes. *J Exp Zool.* 1989;252:89–95.
- Hardy K. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction.* 1999;4:125–134.
- Herrick J.R., Bond J.B., Magarey G.M., Bateman H.L., Krisher R.L., Dunford S.A., Swanson W.F. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of *in vitro* fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown *in vivo*. *Biol Reprod.* 2007;76:858–70.
- Kader A., Choi A., Orief Y., Agarwal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:1–11.
- Klincumhom N., Thongphakdee, A., Techakumphu, M. and Chatdarong, K. Time of the first embryonic cleavage indicates cat blastocyst quality. *Thai J Vet Med.* 2012;42:67–72.
- Kovacic B., Vlaisavljevic V., Importance of Blastocyst Morphology in Selection for Transfer. In: *Advances in Embryo Transfer.* In: InTechOpen 2012:161–176.
- Li J., Foote R.H., Simkin M. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol Reprod.* 1993;49:33–7.
- Luvoni, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology.* 2006;66:101–111.
- Makarevich A.V., Chrenek P., Massanyi P., Lukac N., Pivko J. Apoptosis detection as a tool for the determination of animal embryo quality. *Slovak Journal of Animal Science.* 2008;41:153–159.
- Montag M., Toth B., Strowitzki T. New approaches to embryo selection. *Reprod Biomed Online.* 2013;27:539–46.
- Nizański W., Mikołajewska N., Partyka A., Ochota M. Biotechniki w rozrodzie kotowatych - stan wiedzy, perspektywy i wyzwania. *Medycyna Wet.* 2012;68(9); 529-533.
- Ochota M., Mikołajewska N., Wojtasik B., Jeżewska I., Kaczmarek M., Nizański W. Study on basic procedures for cats' embryo vitrification. 17th EVSSAR Congress : *Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Exotics.* Wroclaw 26 September, 2014; s. 201.
- Pawlikowski M. Postęp medycyny w aspekcie godności człowieka. *Nauka – Etyka – Wiara.* 2011:242–246.
- Pederson M.J., Watson C.A., Blevins B.A., Loskutoff N.M. Domestic cat (*Felis catus*) embryo cryopreservation: slow-slowing versus vitrification. *Reprod Fertil Dev.* 2009;21:180.
- Pope C.E., Gelwicks E.J., Wachs K.B., Keller G.L., Maruska E.J., Dresser B.L. Successful interspecies transfer of embryos from the Indian desert cat (*Felis silvestris ornata*) to the domestic cat (*Felis catus*) following in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 1989;40:61.
- Pope C.E., Gomez M.C., Dresser B.L. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology.* 2006;66(6-7):1518-24.
- Roth T.L., Swanson W.F., Wildt D.E. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*. *Biol Reprod.* 1994;51:441–51.
- Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction.* 2011;141:1–19.
- Suzuki C., Yoshioka K. Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18:789–95.

- Swanson W.F., Brown J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. *Anim Reprod Sci.* 2004;82–83:21–34.
- Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. *J Reprod Dev.* 2012;58:1–9.
- Tsujioka T., Otdorff C., Braun J., Hochi S. Effect of post IVF developmental kinetics on *in vitro* survival of vitrified-warmed domestic cat blastocysts. *Reprod Dom Anim.* 43:323–327.
- Tsutsui T. Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology.* 2006;66(1):122-5.
- Windt M.L., Kruger T.F., Coetzee K., Lombard C.J. Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embryos versus slower dividing embryos. *Hum Reprod.* 2004;19:1155–62.
- Wood T.C., Wildt D.E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 1997;110:355-360.
- Wood T.C., Wildt D.E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 1997;110:355–60.



## OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Analizując pozostały dorobek naukowy chciałabym zwrócić uwagę na następujące kierunki badawcze, które stanowiły przedmiot moich badań.

Pierwsze zadania badawcze, które realizowałam w Katedrze i Klinice Rozrodu dotyczyły neonatologii cieląt. Zajmowałam się badaniem korelacji pomiędzy żywotnością noworodków, a jakością uzyskanej odporności biernej oraz swoistością tejże odporności wobec specyficznych, terenowych patogenów.

Intensyfikacja hodowli bydła i znaczący wzrost produktywności krów mlecznych sprzyja występowaniu niespotykanych w chowie tradycyjnym problemów. Szczególnie istotne z punktu widzenia ekonomicznego są padnięcia noworodków, które mogą sięgać nawet 30%. Uważa się, że zaburzenia przekazywania odporności biernej stanowią jeden z głównych czynników zwiększonej zachorowalności i śmiertelności cieląt. Ze względu na budowę łożyska u krów, cielęta bezpośrednio po porodzie są pozbawione krążących immunoglobulin, a transport bierny przeciwciał rozpoczyna się w ciągu pierwszych godzin po urodzeniu, wraz z pobraniem siary. Uzyskany poziom przeciwciał w surowicy krwi oraz ich swoistość wobec patogenów obecnych w bezpośrednim otoczeniu decyduje o zdrowiu i życiu cielęcia. W przeprowadzonych badaniach skupiałam się na ocenie naporu antygenowego środowiska oraz koncentracji immunoglobulin całkowitych w surowicy i sianie krów oraz surowicy cieląt w różnym czasie po porodzie. Za względu na budowę łożyska u krów surowica cieląt zaraz po urodzeniu nie powinna zawierać krążących Ig lub tylko śladowe ich ilości. U takich noworodków, w przeprowadzonych badaniach, stwierdzono najlepszą absorpcję jelitową przeciwciał w 48 godzinie po porodzie. Ponadto u tych cieląt koncentracja przeciwciał biernych spadała wraz z wiekiem, w przeciwieństwie do noworodków, u których w momencie porodu surowicza koncentracja immunoglobulin przekraczała 0,5 g/l. Wyższe koncentracje przeciwciał w surowicy cieląt pobranej bezpośrednio po porodzie są zwykle związane ze śródmaciczną stymulacją antygenową i koniecznością uruchomienia płodowej produkcji immunoglobulin. Takie noworodki w naszym doświadczeniu były również klasyfikowane jako słabsze w poporodowym badaniu klinicznym oraz często wymagały pomocy przy odpajaniu siarą. Co ciekawe, u zdrowych noworodków koncentracja przeciwciał surowicznych w 48 godzinie życia była prawie dwukrotnie wyższa u badanych jałówek (14,8 g/l) niż buhajków (8 g/l). Może to być związane z większą masą urodzeniową noworodków płci męskiej, a w związku z tym z większym ryzykiem wystąpienia ciężkich porodów u tej płci i rodzenia się słabszych cieląt. Czy też jak sugerują niektórzy badacze większą witalnością

i zdolnościami adaptacyjnymi osobników żeńskich. Ponadto w przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach największe zagrożenie dla badanych cieląt stanowiły *E. coli* serotyp O26:K60, którego bezobjawowymi nosicielami mogą być klinicznie zdrowe krowy. Dodatkowo u wszystkich badanych cieląt stwierdzono odpowiedź immunologiczną w klasach IgG<sub>2</sub> i IgM wobec *Salmonella Dublin*, która to bakteria praktycznie nie była izolowana w posiewach bakteriologicznych w badanych obiektach.

Tematyka ta stała się tematem mojej pracy doktorskiej pt. „Odporność bierna cieląt a status mikrobiologiczny gruczołu mlekowego i środowiska”, która dotyczyła porównania swoistości przeciwciał w sianie, a następnie surowicy noworodków wobec konkretnych patogenów środowiskowych oraz ryzyka wystąpienia zakażeń u nowonarodzonych cieląt, w zależności od poporodowej żywotności cielęcia oraz naporu antygenowego środowiska. Ponadto, uzyskane wyniki zostały opublikowane w następujących artykułach oraz były prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych:

1. **Błaszowska M.**, Twardoń J. Wpływ koncentracji immunoglobulin całkowitych w sianie i surowicy krów na poziom odporności biernej u potomstwa. *Medycyna Wet.* 2006;62(2);185-188.
2. **Błaszowska M.**, Twardoń J., Sobieszczańska B.M. Poziom swoistych przeciwciał w klasach IgG1, IgG2 i IgM w surowicach cieląt wobec wybranych drobnoustrojów środowiskowych, *Medycyna Wet.* 2006;62 (1);103 – 107.
3. **Błaszowska M.** Twardoń, J. Koncentracja IgG1, IgG2 i IgM w sianie krów oraz surowicy cieląt pobranej w różnym czasie po urodzeniu., *Medycyna Wet;* 2005;61(11);308-1311.
4. Sobieszczanska, B. Gryko, R. Dobrowolska, M. **Błaszowska, M.** Twardoń, J. Izolacja Shiga-toksycznych szczepów *Escherichia coli* od zdrowego bydła z regionu Dolnego Śląska, *Med Dosw Mikrobiol* 2005;57(4); 369-376.

Jestem również członkiem zespołu zajmującego się badaniami nad podłożem molekularnym zaburzeń rozwoju płci (*ang. DSD- disorder of sex development*) u zwierząt domowych. Różnicowanie płci to bardzo złożony proces mający miejsce w życiu płodowym, w który zaangażowane jest wiele genów. Podczas różnicowania się płci może dochodzić do rozbieżności pomiędzy płcią genotypową, a późniejszym rozwojem narządów płciowych u danego osobnika. Z punktu widzenia hodowców zwierząt rasowych jest to bardzo istotny problem, gdyż osobniki z zaburzeniami różnicowania się płci są niezdolne do rozrodu, co wyklucza je z dalszej pracy hodowlanej, a pośrednio także wpływa na decyzje co do krzyżowania potencjalnych rodziców.

U zwierząt towarzyszących zaburzenia związane z dziedziczeniem płci klasyfikuje się, podobnie jak w medycynie człowieka, jako nieprawidłowości związane z chromosomami płci lub zaburzenia występujące przy prawidłowym żeńskim lub męskim układzie chromosomów. W przypadku stwierdzenia w badaniu klinicznym nieprawidłowości dotyczących zewnętrznych narządów rozrodczych, kolejnym krokiem jest badanie cytogenetyczne mające na celu ustalenie liczby i budowy chromosomów płci u takiego zwierzęcia. Jak wcześniej wspomniano, różnicowanie się płci jest kontrolowane przez kilkadziesiąt genów, przy czym wiemy już że są wśród nich takie które odgrywają kluczową rolę w powstawaniu gonady męskiej (min. SRY, SOX9, FGF9), żeńskiej (min. WNT4, CTNNB1, FOXL2, RSPO1), dróg wyprowadzających i zewnętrznych narządów płciowych (min. AR, SRD5A, MIS, MISR2). Mimo istotności problemu z punktu widzenia rozrodu zwierząt rutynowa diagnostyka genetyczna DSD nie jest prowadzona w codziennej praktyce weterynaryjnej. Nie mamy więc danych epidemiologicznych dotyczących częstotliwości występowania DSD u psów i kotów. Za najpowszechniejszą formę DSD u psów i kotów uważa się wnętrostwo, którego odsetek u psów wynosi ok. 7% a u kotów 1,5%. Przypuszcza się również, że za niektóre z zaburzeń dziedziczenia płci może być odpowiedzialna terapia hormonalna prowadzona u matki podczas ciąży. Możliwość diagnostyki klinicznej takich przypadków, w połączeniu z analizą molekularną poszerza dotychczasową wiedzę i pozwala na lepsze zrozumienie etiopatogenezy zaburzeń dziedziczenia płci u zwierząt.

W dotychczas przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że najczęstszą przyczyną chromosomalnych DSD u psów jest aneuploidia (monosomia chromosomu X) i trisomia XXY, a u kotów zwykle trisomia XXY. Zaburzenia te były wyjątkowo trudne do rozpoznania klinicznego gdyż powodując niepłodność, nie dawały żadnych anomalii w budowie anatomicznej zewnętrznych narządów płciowych. Natomiast w przypadku wad występujących przy prawidłowym żeńskim układzie chromosomów najczęściej stwierdzaliśmy nieobecność genu SRY, którego brak uniemożliwia translokację pomiędzy chromosomem Y i X. U takich zwierząt stwierdzaliśmy zwykle obecność jąder lub jajnikojąder, macicy, jajowodów i często nasieniowodów, a narządy zewnętrzne były ukształtowane jak u samic, przy czym łechtaczka była wyraźnie powiększona. Wada ta ma charakter dziedziczny, ale jej podłoże molekularne nie jest w pełni rozpoznane. Nasze badania wskazują jest związana z polimorfizmem typu CNV (*ang. copy number variation*), który zaburza ekspresję genów SOX9 i SRY. Ostatnią badaną przez nas wadą było spodziectwo. Uważa się, że podłoże tej wady jest poligenetyczne, a geny związane z jej występowaniem to: SRD5A2, MAMLD1 oraz RXFP2. Przy czym w badaniach przeprowadzonych przez nasz zespół, u czterech kocurów z klinicznie rozpoznany spodziectwem nie wykazaliśmy związku powyższych genów z tą wadą.

Nie prowadzi się zbyt wielu badań w tym zakresie ze względu na ograniczoną dostępność materiału i świadomość właścicieli i hodowców zwierząt towarzyszących. Tylko ścisła współpraca pomiędzy lekami weterynarii, genetykami i hodowcami zwierząt rasowych może przyczynić się do rozwoju wiedzy o genomie psa i kota i w przyszłości przynieść odpowiedzi na temat dotychczas niewyjaśnionych przyczyn DSD. Wiedza ta jest szczególnie cenna dla nauki i praktyki weterynaryjnej, a także hodowli zwierząt towarzyszących. W ramach tej współpracy opublikowano następujące artykuły:

1. Szczerbal I., Nizański W., Dzimira S., Nowacka-Woszuk J., **Ochota M.**, Switonski M. X monosomy in a Virilized Female Cat. *Reprod Dom Anim*; 2015;50(2);344–348.
2. Nowacka-Woszuk J., Szczerbal I., Salamon S., Kociucka B., Jackowiak H., Prozorowska E., Ślaska B., Rozanska D., Orzelski M., **Ochota M.**, Dzimira S., Lipiec M., Nizański W., Switonski M. Testicular disorder of sex development in four cats with a male karyotype (38,XY; SRY-positive). *Anim Reprod Sci*; 2014;151;(1–2);42–48.
3. Salamon S., Nowacka-Woszuk J., Szczerbal I., Dzimira S., Nizański W., **Ochota M.**, Switonski M. A lack of association between polymorphisms of three positional candidate genes (CLASP2, UBP1, and FBXL2) and canine disorder of sexual development (78,XX; SRY-negative). *Sex Dev*; 2014;8(4);160-165.
4. Szczerbal I., Nowacka-Woszuk J., Nizański W., Salamon S., **Ochota M.**, Dzimira S., Atamaniuk W., Switonski M. A case of leucocyte chimerism (78,XX/78,XY) in a dog with a disorder of sexual development. *Reprod Dom Anim*; 2014;49(3);31-34.
5. Switonski M., Payan-Carreira R., Bartz M., Nowacka-Woszuk J., Szczerbal I., Colaço B., Pires M.A., **Ochota M.**, Nizański W. Hypospadias in a male (78,XY; SRY-positive) dog and sex reversal female (78,XX; SRY-negative) dogs: clinical, histological and genetic studies. *Sex Develop*;2012;6(1-3);128-134.

W ostatnich latach zajmowałam się również badaniami dotyczącymi pozyskiwania i oceny nasienia pochodzącego od kota domowego. Przez wiele lat głównym ograniczeniem w tej dziedzinie badań była niezwykle trudna technika pozyskiwania plemników. Niecałe 10 lat temu opracowano prostą i bezpieczną metodę pobierania nasienia, w której ejakulat pobiera się bezpośrednio z cewki moczowej po podaniu środka alfa-2-mimetycznego. Przewyciężenie obiektywnych trudności w pozyskiwaniu nasienia od kotowatych otworzyło drogę do prac związanych z jego oceną i konserwacją. Tym niemniej metoda ta jest jeszcze stosunkowo nowa i brak jest dokładnych opracowań naukowych dotyczących właściwości plemników uzyskanych tą drogą, jak też ich zdolności zapłodnieniowej.

Moje zainteresowania badawcze koncentrowały się przede wszystkim na ocenie skuteczności podawania  $\alpha$ -2 mimetyku do pozyskiwania nasienia z cewki moczowej u kota domowego i ocenie jakości w ten sposób pozyskanego ejakulatu. W prowadzonych badaniach pobrano na drodze katetyzacji cewki moczowej i oceniono nasienie od 214 kocurów różnych ras, w różnym wieku i o różnym statusie reprodukcyjnym. Pozyskane nasienie było poddawane rutynowej ocenie i analizie w aparacie CASA oraz porównywane do nasienia pozyskanego z najądrzy. Dodatkowo sprawdzaliśmy wpływ stopnia rozrzedzenia na jakość pobranego ejakulatu. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły skuteczność katetyzacji cewki moczowej po farmakologicznej indukcji z użyciem medetomidyny, do pozyskania nasienia od kota domowego. Poza nielicznymi wyjątkami zarówno liczba plemników, jak ich ruchliwość, żywotność i morfologia były podobne w przypadku nasienia cewkowego i najądrzowego. Mimo że w ocenie CASA nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy nasieniem cewkowym i najądrzowym, nasienie cewkowe wydaje się dawać bardziej obiektywne wyniki niż nasienie najądrzowe często zawierające elementy morfotyczne krwi i detrytus komórkowy. Ponadto badane nasienie kota domowego charakteryzowało się dużym odsetkiem teratospermii, który znacząco obniżał wyniki oceny w aparacie CASA. Stopień rozrzedzenia miał również wpływ na jakość badanych plemników. Wraz wzrastającym rozrzedzeniem malała liczba ruchliwych i nieuszkodzonych plemników, co sugeruje znaczącą rolę plazmy nasienia w zachowaniu właściwości ejakulatu oraz pokazuje jak łatwo czynniki zewnętrzne mogą zmienić właściwości nasienia.

Z praktycznego punktu widzenia farmakologiczna indukcja okazała się łatwą i dostępną w codziennej praktyce metodą pozwalającą na pozyskanie i ocenę ejakulatu praktycznie od każdego kocura, który nie ma klinicznych przeciwwskazań do stosowania medetomidyny. Prowadzone badania pozwoliły na analizę porównawczą nasienia cewkowego i najądrzowego, ocenę przydatności plemników uzyskanych z cewki moczowej do innych procedur biotechnicznych oraz ustalenie wartości granicznych dla tych plemników, a w efekcie ocenę (pośrednią) płodności samca. Efektem w/w badań są następujące publikacje naukowe:

1. Prochowska S., Nizański W., **Ochota M.**, Partyka A. Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats - A retrospective study of 214 cases. *Theriogenology*; 2015;84 (9);1565–1571.
2. Prochowska S., Nizański W., **Ochota M.**, Partyka A. Effect of dilution rate on feline urethral sperm motility, viability, and DNA integrity. *Theriogenology*; 2014;82(9);1273–1280.

3. Partyka A., Nizański W., **Ochota M.** Methods of assessment of cryopreserved semen. W: Current frontiers in cryobiology; Ed. by Igor I. Katkov; Rijeka, Croatia: InTech, February, 2012;s. 547-574.
4. **Ochota M.**, Nizański W., Twardoń J. Pozyskiwanie i rozwój in vitro oocytów kota domowego w świetle współczesnych badań; Medycyna Wet; 2010;66(10); 659-662.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Ochota". The signature is written in a cursive style with a vertical line on the left side.

