

Zaburzenia płodności obserwowane są w hodowli bydła, gdyż selekcja zwierząt na cechy produkcyjne znacząco obniżyła parametry płodności. Także w medycynie człowieka niepłodność jest problemem ogólnoswiatowym dotykającym od 8 do 12% par w wieku reprodukcyjnym. Pomimo, iż czynnik męski jest przyczyną ponad połowy przypadków niepłodności, w wielu społeczeństwach problem ten w głównej mierze spoczywa na barkach kobiety. Niepłodność kobiet jest zjawiskiem kompleksowym łączącym wpływ takich czynników, jak np. żywienie czy stan fizjologiczny. Parametry te wpływają nie tylko na ogólny metabolizm organizmu kobiety, ale również na jakość oocytów i zarodków poprzez zaburzenia metabolizmu kwasów tłuszczowych i glukozy. Badania pokazują, że zaburzenia metabolizmu kwasów tłuszczowych i glukozy mają kluczowe znaczenie dla zdrowia kobiety, co ma silny wpływ na płodność. Zjawisko takie zaobserwowano u człowieka (kobiety otyłe, z cukrzycą) ale także u innych gatunków np. u bydła (ujemny bilans energetyczny u krów mlecznych). Głównym produktem przemian lipidów i glukozy jest energia, niezbędna dla ogólnego prawidłowego metabolizmu komórki. W obrębie oocyty, głównym źródłem energii jest glukoza, jednakże literatura opisuje prawdopodobną równowagę pomiędzy tymi dwiema ścieżkami w celu zachowania odpowiedniej homeostazy w komórce. Tak więc głównym celem proponowanego projektu jest charakterystyka metabolizmu energetycznego w oocytach bydła podczas dojrzewania *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem przemian glukozy i kwasów tłuszczowych.

W proponowanym projekcie planowane jest selektywne blokowanie ścieżek metabolicznych glukozy lub kwasów tłuszczowych w celu wykazania, jak zmiany te wpływają na jakość oocytów i późniejszych zarodków. Planowana jest grupa kontrolna i 4 grupy eksperymentalne, które różnić się będą dodatkiem czynników blokujących selektywnie poszczególne ścieżki metaboliczne [1 – grupa kontrolna, 2 – dojrzewanie w warunkach inhibicji glikolizy (ścieżki metabolizmu glukozy), 3 – dojrzewanie w warunkach inhibicji ścieżki pentozo-fosforanowej (PPP, szlaku metabolizmu glukozy), 4 – dojrzewanie z jednoczesnym blokowaniem glikolizy i PPP, w celu niemal całkowitego zatrzymania metabolizmu glukozy, 5 – dojrzewanie w warunkach inhibicji β -oksydacji kwasów tłuszczowych].

Z każdej z grup eksperymentalnych pozyskiwane będą następujące próby i poddawane następującym analizom: (a) indywidualne oocyty (analiza wybranych produktów metabolizmu glukozy i kwasów tłuszczowych np. ATP, NADPH, GSH, wolne rodniki tlenowe itp.), (b) komórki pęcherzykowe pochodzące z indywidualnych kompleksów oocyt-komórki pęcherzykowe (COCs, analiza ekspresji mRNA wybranych genów zaangażowanych w metabolizm glukozy i kwasów tłuszczowych; PCR w czasie rzeczywistym) i (c) pożywka do dojrzewania. Analiza metabolomiczna indywidualnych oocytów, komórek pęcherzykowych pochodzących z indywidualnych COCs a także pożywki do dojrzewania pochodzącej z indywidualnych dołków hodowlanych pozwoli na uzyskanie danych o koncentracji np. glukozy, pirogronianu, mleczanu i kwasów tłuszczowych (spektrometria mas). Planowane jest także pozyskanie zarodków w warunkach *in vitro* (zapłodnienie wysokiej jakości nasieniem buhaja, hodowla *in vitro*) po dojrzewaniu oocytów w grupach eksperymentalnych opisanych powyżej. Zostanie zastosowany system obrazowania rozwoju zarodków w czasie rzeczywistym w celu wykazania wpływu modyfikacji metabolizmu energetycznego podczas dojrzewania na rozwój przedimplantacyjny zarodków. Ostatecznym stadium rozwoju zarodkowego będzie blastocysta (uzyskana 9 dni po zapłodnieniu), która będzie analizowana pod kątem częstości uzyskiwania tego stadium, morfologii, zawartości kwasów tłuszczowych i ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm kwasów tłuszczowych i glukozy.

Autorzy proponowanego projektu planują odpowiedzieć na pytanie, czy oocyt bydlęcy podczas dojrzewania *in vitro* potrafi w pewnym zakresie selektywnie modyfikować metabolizm kwasów tłuszczowych i glukozy, w celu dostosowania się do zmiennych warunków środowiskowych. W ramach proponowanego projektu modyfikacjom poddane będą warunki dojrzewania *in vitro*, jednakże można to odnieść do warunków *in vivo*, gdy skład płynu pęcherzykowego ulega zmianie pod wpływem zdrowia samicy. Uzyskane dane mogą pokazać, czy oocyty potrafią zaadaptować się w niekorzystnym środowisku, a w przypadku odpowiedzi pozytywnej – w jaki sposób się to odbywa.