

Wysoka wydajność reprodukcyjna jest jednym z najważniejszych aspektów poprawy produkcji zwierzęcej. Efektywna produkcja zarodków *in vitro* jest aktualnie głównym celem przemysłu produkcji zwierzęcej i jednocześnie jedną z wiodących metod biotechnologicznych wpływających na poprawę wydajności rozrodczej bydła. Duże zróżnicowanie jakości pobieranych, przyżyciowo lub pośmiertnie, komórek jajowych stanowi niezmiennie wyzwanie dla wydajności produkcji *in vitro* zarodków wpływając na ograniczenie ich współczynników rozwojowych. Selekcja komórek jajowych najwyższej jakości jest kluczowa w produkcji zarodków o wysokich współczynnikach rozwojowych. Dlatego poszukiwanie właściwych markerów jakości komórek jajowych oraz markerów możliwości implantacyjnych i zdolności rozwojowej zarodków jako alternatywa dla do tej pory rutynowo używanej subiektywnej oceny morfologicznej, jest przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych.

Mitochondria pełnią istotną rolę w dojrzewaniu komórki jajowej i dalszym rozwoju zarodka, będąc odpowiedzialne za produkcję ATP jako głównego źródła energii w komórce. Obecność mitochondriów w komórce jajowej konieczna jest do wspierania glikolizy od dojrzewania oocyta, poprzez wczesny rozwój zarodka aż do stadium blastocysty. U krowy stwierdzono redukcję mitochondrialnego DNA w słabej jakości komórkach jajowych ocenianych na podstawie ich morfologii. Dodatkowo, komórki wieńca promienistego, pozyskiwane po zapłodnieniu *in vitro* dają możliwość nieinwazyjnej oceny ich jakości, na podstawie zawartości mitochondrialnego DNA, biorąc pod uwagę wykazaną wyższą liczbę kopii mitochondrialnego DNA w komórkach wieńca promienistego korelującą z wyższą jakością zarodków świńskich, ludzkich i bydłowych. Dlatego w niniejszych badaniach zakładamy, że zawartość mitochondrialnego DNA w komórkach wieńca promienistego jest ściśle związana z jakością komórek jajowych, z uwagi na ich bezpośredni udział w międzykomórkowej komunikacji oraz w nabywaniu zdolności rozwojowej komórki jajowej.

W projekcie, planujemy oznaczyć markery molekularne jakości komórek jajowych u krowy, w oparciu o dobrze zdefiniowany w literaturze model do badania dobrej i złej jakości komórek jajowych, na podstawie dojrzałości płciowej zwierząt. Zdolność rozwojowa komórek jajowych pozyskanych od zwierząt niedojrzałych płciowo jest statystycznie niższa w porównaniu do krów. Udowodniono również, że transfer blastocyst wyhodowanych z komórek jajowych pochodzących z oocytów od zwierząt niedojrzałych płciowo, doprowadził do znacznie niższego współczynnika zacieleń w porównaniu do zwierząt dojrzałych płciowo. Poza danymi na temat zaburzeń biochemicznych w oocytach pochodzących od zwierząt niedojrzałych płciowo, takich jak zaburzenia syntezy białek, zaburzenia metabolizmu energetycznego, czy obniżonej aktywności czynników biorących udział w dojrzewaniu komórek, niewiele jest wiadomo na temat molekularnej charakterystyki tych oocytów, wyrażającej się zróżnicowaniem profilu transkrypcji mRNA. Nie wiadomo, również jaka jest różnica pomiędzy profilem transkrypcyjnym określonych genów w zarodkach wyhodowanych *in vitro* z komórek jajowych pochodzących od zwierząt dojrzałych i niedojrzałych płciowo. Oznaczenie tych profili ekspresji pozostaje w obszarze zainteresowań tego projektu, szczególnie w zakresie zbadania czynników uczestniczących w funkcji mitochondriów, markerów jakości i zdolności implantacyjnej blastocyst.

Biorąc powyższe pod uwagę, naukowym celem projektu jest zbadanie czy mitochondrialne i metaboliczne zmiany podczas wczesnego rozwoju zarodków bydłowych *in vitro* mogą odzwierciedlać jakość komórek jajowych. W projekcie przewidziano realizację następujących celów szczegółowych: [1] oznaczenie zależności pomiędzy poziomem uszkodzenia mitochondrialnego DNA na różnych etapach rozwoju zarodkowego a jakością komórki jajowej, [2] określenie zależności pomiędzy poziomem uszkodzenia mitochondrialnego DNA i zaburzeniami metabolicznymi w komórkach wieńca promienistego, otaczającym zapłodniony oocyt a jakością komórki jajowej, jak również [3] oznaczenie wpływu poziomu uszkodzenia mitochondrialnego DNA w komórkach wieńca promienistego i ich profili transkryptycznych na współczynnik zacieleń po transferze blastocyst.

W proponowanym projekcie planujemy oznaczenie mitochondrialnych i metabolicznych zmian podczas wczesnego rozwoju zarodków *in vitro*. W tym celu określony zostanie poziom uszkodzenia mitochondrialnego DNA w komórkach wieńca promienistego otaczających zapłodniony oocyt oraz w zarodkach bydłowych wyhodowanych *in vitro* na różnych etapach ich przedimplantacyjnego rozwoju pochodzących z komórek jajowych dobrej i złej jakości. Dodatkowo, przeprowadzona zostanie analiza profilu transkrypcyjnego przedimplantacyjnych zarodków wyhodowanych z oocytów dobrej i złej jakości w zależności od poziomu uszkodzenia mitochondrialnego DNA w komórkach wieńca promienistego. Dodatkowo, w komórkach wieńca promienistego po zapłodnieniu *in vitro* oznaczona zostanie zawartość ATP i aktywność enzymów zaangażowanych w metabolizm glukozy. W celu określenia wyniku zapłodnienia, w komórkach jajowych dobrej i złej jakości, określony zostanie stopień penetracji plemników oraz stopień stwardnienia osłonki przejrzystej oocyta. Na koniec, oznaczony zostanie współczynnik zacieleń po transferze blastocyst do bioreaktorów, w zależności od poziomu uszkodzenia mitochondrialnego DNA w komórkach wieńca promienistego, oraz określonego profilu transkrypcyjnego.