

Ogromny postęp przemysłowy oraz agresywna ekspansja człowieka w środowisko naturalne spowodowały znaczne ograniczenie nisz ekologicznych dzikich zwierząt oraz postępujące wymieranie poszczególnych gatunków. Problem ten dotyczy także dzikich kotowatych. Znaczne zanieczyszczenie środowiska, chów wsobny oraz choroby zakaźne obniżają wskaźniki reprodukcyjne, prowadząc do olbrzymiego spadku bioróżnorodności. Liczebność populacji Rysia euroazjatyckiego w Polsce od dawna kwalifikuje go do ścisłej ochrony. Podobnie, wszystkim gatunkom dzikich kotów grozi wyginięcie, na niektórych obszarach ich naturalnego występowania. W obliczu tak krytycznej sytuacji, należy uświadomić sobie, iż materiał genetyczny każdego pojedynczego osobnika jest na wagę złota. Pozyskanie i zamrożenie materiału od postrzelonych, padłych lub poddanych eutanazji zwierząt pozwala na pośmiertne zachowanie ich potencjału reprodukcyjnego oraz genetycznego. W ratowaniu dzikich zwierząt zastosowanie znajdują techniki wspomaganego rozrodu oraz kriokonserwacji gamet. Procedury mrożenia gamet męskich u kotów są dobrze opracowane, w przeciwieństwie do niskiej efektywności kriokonserwacji gamet żeńskich. Mała wydajność mechanicznego pozyskiwania izolowanych oocytów (do kilkudziesięciu komórek jajowych od jednego osobnika) oraz niedopracowane procedury kriokonserwacji prowadzą do znacznych strat bezcennego materiału. Obiecującym rozwiązaniem może stać się zamrażanie natywnej tkanki jajnikowej wraz z całą pulą komórek jajowych. Obiecujące wyniki mrożenia tkanki jajnikowej człowieka (dotychczas uzyskano 130 narodzin) rysują perspektywę dla rozwoju wityfikacji tkanki jajnikowej i ochrony materiału genetycznego u dzikich kotowatych.

Celem projektu jest redukcja krio-indukowanego stresu komórek poddawanych procedurom *in vitro* dla konserwacji materiału genetycznego od rzadkich i zagrożonych gatunków z rodziny kotowatych. W ramach projektu zbadany zostanie wpływ: składu medium transportowego, parametrów fizykochemicznych protokołu mrożenia oraz wdrożenia rekonwalescencji komórek poddanych mrożeniu na parametry biologiczne pęcherzyków jajnikowych.

Jajniki kota domowego pozyskane na drodze rutynowych sterylizacji, zostaną odpowiednio przygotowane i poddane procedurom *in vitro*. Początkowo zostanie oceniony wpływ roztworów do konserwacji, wielkości fragmentów tkanki jajnikowej oraz suplementacji antyoksydantami i inhibitorami śmierci komórkowej (dysmutaza ponadtlenkowa, N-acetylo-L-cysteina, glutation, inhibitor proteaz z rodziny calpain, inhibitor caspas) na przeżywalność, strukturę oraz apoptozę pęcherzyków jajnikowych. Opracowany sposób transportowania tkanki jajnikowej zostanie oceniony w odniesieniu do efektywności wolnego zamrażania. Kolejnym zadaniem jest wieloczynnikowa optymalizacja parametrów procedury szybkiego mrożenia – (wityfikacji), tj. czasu inkubacji, krioprotektów oraz wielkości fragmentów tkanki jajnikowej. Szczegółowa ocena zjawiska stresu oksydacyjnego oraz apoptozy pęcherzyków jajnikowych zostanie przeprowadzona po zastosowaniu pozaustrojowej hodowli tkankowej. Następnie zajmiemy się opracowaniem medium do rekonwalescencji pęcherzyków tkanki jajnikowej poddawanej wityfikacji. Wpływ suplementacji mediów zostanie oceniony jak przy użyciu powyżej opisanej metodologii (techniki histologiczne, immunohistochemia oraz mikroskopia florescencyjna).

Proponowane badania eksperymentalne z zastosowaniem suplementacji mediów do transportu oraz po-rozmrożeniowej rekonwalescencji komórek ocenią możliwość redukcji stresu komórkowego wywołanego przez przechowywanie tkanki jajnikowej w niskich temperaturach. Zatem, badania przyczynia się do rozwoju kriobiologii i biologii komórek rozrodczych u kotowatych. Optymalizacja protokołu wityfikacji tkanki jajnikowej kotowatych, dzięki niskim wymaganiom sprzętowym oraz mało skomplikowanym procedurom, umożliwi przeprowadzanie jej w terenie. Tym bardziej, że zaplecze sprzętowe i możliwości laboratoryjne ambulatoriów istniejących przy rezerwach dzikich zwierząt, czy nawet ogrodów zoologicznych nie jest tak zaawansowane, jak w ośrodkach naukowych. Opracowując łatwą i szybką metodę mrożenia, zyskamy cenne narzędzie pozwalające zachować materiał genetyczny dzikich kotowatych na wiele lat. Zatem najważniejszym aspektem projektu suplementacji mediów do kriokonserwacji tkanki gonadalnej kotowatych oprócz możliwości poznania mechanizmów obrony komórkowej przed ekstremalnymi warunkami mrożenia, jest również przyczynienie się do utworzenia banku materiału genetycznego ginących populacji dzikich kotowatych.