

Pierwsze udane doniesienia o dojrzewaniu w warunkach *in vitro* (*in vitro maturation* – IVM) oocytów koniowatych i wykorzystaniu ich do produkcji zarodków pochodzą z lat 80. XX wieku. W tym okresie badania nad procesem IVM, zapłodnieniem *in vitro* (*in vitro fertilization* – IVF) czy hodowlą zarodków *in vitro* (*in vitro culture* – IVC) u innych gatunków zwierząt, jak bydło, owce czy świny, były na zaawansowanym poziomie, odpowiadając na podstawowe pytania naukowe, ale także znajdując zastosowanie w przemyśle komercyjnym. Głównym czynnikiem ograniczającym stosowanie i rozwój metod wspomaganego rozrodu (*assisted reproductive technology* – ART) u koniowatych jest niska dostępność materiału badawczego. Wyraźnie niższa wydajność przyżyciowego uzyskiwania oocytów u koni spowodowana jest specyficzną budową jajnika, która prowadzi do występowania problemów z indukowaniem superowulacji. Co więcej, pośmiertne pozyskiwanie oocytów jest ograniczone ze względu na trudny dostęp do materiału rzeźnego. Z tych powodów ART u koni wciąż pozostają na niezadowalającym poziomie, czego potwierdzeniem jest brak możliwości wykonywania klasycznego IVF oraz istotnie niższe wskaźniki dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*, sięgające zaledwie około 50%, przy nawet 90% w przypadku przeżuwaczy.

Proces IVM odbywa się w pożywkach hodowlanych, których zadaniem jest zapewnienie oocytom warunków w jak największym stopniu zbliżonych do fizjologicznych. Jednak pożywki stosowane u koniowatych przygotowywane są w oparciu o składniki pożywek stosowanych u innych gatunków, ponieważ specyficzne wymagania końskich oocytów podczas tego procesów wciąż pozostają w dużej mierze nieznanymi. Pomimo stosowania różnych składników w celu suplementacji pożywek hodowlanych, wciąż nie wiadomo, które z nich wchodzi w interakcje z gametami i zarodkami. Wiadomo jednak, że procesy komunikacji międzykomórkowej w obrębie jajnika i mikrośrodowiska pęcherzyka jajnikowego są podstawowymi mechanizmami umożliwiającymi dojrzewanie oocytów. Rozwój oocytów obejmuje procesy, w których gameta przechodzi dojrzewanie cytoplazmatyczne, jądrowe i molekularne. Podczas wszystkich etapów dojrzewania oocytów niezbędna jest komunikacja komórkowa między oocytem a otaczającymi go komórkami ziarnistymi, a także zachodzenie procesu nazywanego ekspansją komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego. W ostatnich latach wykazano, że przekazywanie sygnału pomiędzy komórkami może zachodzić za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (*extracellular vesicles* – EV), które posiadają zdolność do dostarczania sygnałów molekularnych do komórek docelowych. EV są ważnym składnikiem płynów ustrojowych, takich jak płyn pęcherzykowy jajnika, dzięki czemu są cząsteczkami szeroko badanymi pod kątem ich roli w komunikacji międzykomórkowej oraz wpływu na ART.

Wykazano, że EV pozyskane z płynu pęcherzykowego jajnika (ffEVs) zawierają bioaktywne składniki, takie jak miRNA, które wpływają na geny związane z metabolizmem, reprodukcją i funkcjami endokrynnymi, co ma ogromne znaczenie dla udanej ciąży. Ostatnie doniesienia wskazują, że ffEVs wpływają na ekspresję wybranych genów komórek ziarnistych, a także ekspansję komórek wzgórka jajonośnego u bydła i myszy. Jednak dowody wskazujące na fizjologiczny wpływ ffEVs na funkcje komórek ziarnistych u koni domowych podczas IVM nie zostały jeszcze wykazane. Hipoteza badawcza zakłada, że ffEVs mogą wpływać na fizjologię i morfologię kompleksu oocyt-kumulus i wywoływać zmiany w transkrypcji komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego, które mogą pomóc w stworzeniu korzystnego mikrośrodowiska dla dojrzewania oocytów, zapłodnienia i wczesnego rozwoju zarodkowego. Celem projektu jest ocena wpływu ffEVs z małych (<20 mm) i dużych (>30 mm) pęcherzyków na żywotność, ekspansję i modulację transkrypcji komórek ziarnistych wzgórka jajonośnego.

Do realizacji badań wykorzystane zostaną jajniki klaczy, które pozyskane będą z lokalnej rzeźni. Za pomocą ultrawirowania z płynu pęcherzykowego jajnika wyizolowane zostaną EV. W kolejnym etapie oocyty pozyskane z pęcherzyków jajnikowych poddane zostaną dojrzewaniu *in vitro* z wykorzystaniem suplementacji w postaci ffEV. W celu oceny wpływu ffEVs na ekspansję komórek ziarnistych wykonane zostaną pomiary średnicy kompleksów oocyt-kumulus przed i po IVM. Po zakończeniu hodowli oocyty poddane będą barwieniu, za pomocą którego oceniona zostanie przeżywalność komórek ziarnistych. Dodatkowo, przeprowadzone zostanie sekwencjonowanie następnej generacji oraz analiza bioinformatyczna, które umożliwią przeprowadzenie oceny zmian zachodzących na poziomie transkrypcji w komórkach ziarnistych poddanych działaniu ffEVs.

Suplementacja pożywek na różnych etapach wspomaganego rozrodu za pomocą ffEVs może być doskonałym uzupełnieniem fizjologicznych potrzeb gamet i zarodków na wczesnych stadiach rozwoju. Zrozumienie wpływu ffEVs na zmiany transkrypcji komórek ziarnistych może przybliżyć nas do zrozumienia mechanizmów, za pomocą których EVs wpływają na komórki docelowe. Dlatego dążymy do poszerzenia podstawowej wiedzy na temat roli ffEVs w istotnych procesach ekspansji komórek ziarnistych i dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*.