

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.:

„Wpływ zmodyfikowanych warunków dojrzewania *in vitro* oocytów oraz jakości i sposobu przygotowania nasienia knura na pozaustrojowe zapłodnienie u świni”

Katarzyna Poniedziałek-Kempny

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Gajda

Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji
Instytut Zootechniki, Państwowy Instytut Badawczy

Pozaustrójowa produkcja zarodków (IVP) u świń wciąż pozostaje obiektem wielu badań, gdyż nadal nie rozwiązano szeregu problemów jakie napotykają stosujący tę metodę. W pozaustrojowej produkcji zarodków znaczącymi problemami są: jakość oocytów dojrzewających *in vitro*, jakość nasienia po kapacytacji, polispermia oraz jakość uzyskanych *in vitro* zarodków. Mimo niewątpliwego postępu, efektywność i powtarzalność metody IVP, zwłaszcza w przypadku świni, nie jest jeszcze zadawalająca.

Celem przeprowadzonych badań była modyfikacja warunków hodowli *in vitro* niedojrzałych oocytów świni oraz ustalenie parametrów jakości nasienia knura po kapacytacji mogących mieć wpływ na prawidłowe zapłodnienie *in vitro* u świni. W ramach celu głównego podjęto badania nad: 1. wpływem tymozyny, kwasu hialuronowego oraz wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na dojrzewanie *in vitro* oocytów świni oraz zapłodnienie *in vitro*; 2. podatnością na kapacytację nasienia ejakulowanego, najądrzowego i pozbawionego osocza; 3. oceną *in vitro* i *in vivo* zarodków świni uzyskanych w wyniku zapłodnienia *in vitro*.

Materiał doświadczalny stanowiły niedojrzałe oocyty świni pozyskiwane z jajników poubojowo, nasienie ejakulowane pochodzące od knurów różnych ras oraz nasienie najądrzowe uzyskane z najądrzy knurów po uboju. Niedojrzałe oocyty hodowano *in vitro* do stadium metafazy II w pożywce z dodatkiem hormonu grasicy-tymozyny (TYM) lub kwasu hialuronowego (HA). Część oocytów przed lub po dojrzewaniu poddawano wysokiemu ciśnieniu hydrostatycznemu (HHP). Grupę kontrolną stanowiły niedojrzałe oocyty hodowane w pożywce standardowej i nie poddawane HHP. Nasienie ejakulowane i najądrzowe poddawano ocenie pod mikroskopem oraz przy użyciu komputerowo wspomaganą analizy SCA. Część nasienia ejakulowanego wirowano w celu usunięcia osocza. Wyselekcjonowane nasienie ejakulowane, najądrzowe i pozbawione osocza poddawano kapacytacji. Nasienie o prawidłowych parametrach po kapacytacji przeznaczano do zapłodnienia *in vitro*. Uzyskane potencjalne zygoty hodowano *in vitro* do stadium ekspandującej blastocysty. Czas trwania hodowli wynosił 6-8 dni. Uzyskane blastocysty poddawano ocenie jakości której kryterium

stanowiła liczba komórek oraz stopień fragmentacji jądrowego DNA. Część potencjalnych zygot oraz 2-4 komórkowych zarodków poddano ocenie *in vivo*, po transferze do zsynchronizowanych biorczyń. Ocenę skuteczności transferu dokonywano na podstawie badania biorczyń przy pomocy USG w 30 i 45 dniu po przeniesieniu zarodków.

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowana modyfikacja warunków dojrzewania *in vitro* oocytów świni polegająca na suplementacji pożywki do hodowli hormonem grasicy-tymozyną umożliwiła uzyskanie wysokiego odsetka kompetentnych oocytów (97%) charakteryzujących się wysoką zdolnością do zapłodnienia i rozwoju do stadium blastocysty. Jednocześnie tymozyna zastosowana w pożywce do dojrzewania oocytów świni miała korzystny wpływ na jakość uzyskanych blastocyst poprzez ograniczenie występowania apoptozy. Stwierdzono, że dodatek kwasu hialuronowego do pożywki do dojrzewania oocytów świni nie przyniósł poprawy ich kompetencji rozwojowych oraz zdolności do zapłodnienia *in vitro*. Nie wykazano pozytywnego wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na dojrzewanie oocytów świni oraz na zapłodnienie *in vitro*. Poddając nasienie knura kapacytacji *in vitro* obserwowano podobną podatność na ten proces zarówno nasienia ejakulowanego i najądrzowego jak i pozbawionego osocza. Metoda usuwania osocza z nasienia knura nie miała pozytywnego wpływu na jego zdolność do kapacytacji jak również na zapłodnienie *in vitro*. Najwyższą efektywność zapłodnienia *in vitro* mierzoną odsetkiem blastocyst uzyskano w przypadku nasienia ejakulowanego (26%) i najądrzowego (30%). Zarodki świni uzyskane po zapłodnieniu *in vitro* oocytów dojrzałych w obecności tymozyny były zdolne do pełnego rozwoju *in vivo*, po transferze do zsynchronizowanych biorczyń.

Balice, 25.07.2018