

# **AUTOREFERAT**

**Dr PAWEŁ ANTOSIK**

**KATEDRA WETERYNARII**

**WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT**

**UNIwersytet PRZYRODNICZY**

**W POZNANIU**

**POZNAŃ 2012**

<b>Spis treści</b>	<b>strona</b>
<b>Dane osobowe oraz przebieg pracy naukowej i zawodowej</b>	
1. Dane osobowe	4
2. Wykształcenie	4
3. Przebieg pracy zawodowej	5
<b>Osiągnięcia przed uzyskaniem stopnia doktora</b>	
A. Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	6
B. Publikacje naukowe w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	6
C. Prace konferencyjne	8
<b>Osiągnięcia po uzyskaniu stopnia doktora</b>	
<b>I. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust.2 ustawy</b>	9
A. Tytuł	9
B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	9
C. Opis badań stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust.2 ustawy	11
<b>II. Wykaz innych (nie wchodzących w skład osiągnięcia w pkt I) opublikowanych prac naukowych oraz wskaźniki dokonań naukowych</b>	32
A. Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	32
A.1 Opis pozostałych osiągnięć naukowych niewchodzących w skład osiągnięć wymienionych w pkt I	39
A.2 Zestawienie liczbowe osiągnięć w pracy naukowo-badawczej	41
B. Udzielone patenty międzynarodowe i krajowe	42
C. Wynalazki oraz wzory użytkowe i przemysłowe, które uzyskały ochronę i zostały wystawione na międzynarodowych lub krajowych wystawach lub targach	42
D. Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w pkt IIA	42
E. Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyzy, utworów i dzieł artystycznych	43
F. Sumaryczny impact factor	43
G. Liczba cytowań według bazy Web of Science	43
H. Index Hirsha według bazy Web of Science	43
I. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach	43

---

J. Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową albo artystyczną	44
K. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych	45
<b>III. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta</b>	46
A. Uczestnictwo w programach europejskich oraz innych programach międzynarodowych i krajowych	46
B. Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych	46
C. Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych	51
D. Otrzymane nagrody i wyróżnienia inne niż wymienione w pkt III	51
E. Udział w konsorcjach i sieciach badawczych	51
F. Kierowanie projektami realizowanymi we współpracy z naukowcami z innych ośrodków polskich i zagranicznych oraz we współpracy z przedsiębiorcami, innymi niż wymienione w pkt II-I	51
G. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism	51
H. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych	52
I. Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki i sztuk	52
J. Opieka naukowa nad studentami i lekarzami w toku specjalizacji	52
K. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego	53
L. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich	53
M. Wykonane ekspertyzy lub inne opracowania na zamówienie	53
N. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych	53
O. Recenzowanie projektów międzynarodowych i krajowych	54
P. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych	54
Q. Inne osiągnięcia, nie wymienione w pkt IIIA – IIIP	54
<b>IV. Załączniki</b>	56
A. Dyplom potwierdzający uzyskanie tytułu naukowego doktora	57
B. Oświadczenia współautorów	59
C. Prace stanowiące szczególne osiągnięcie	72

## DANE OSOBOWE ORAZ PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ I ZAWODOWEJ

### 1. DANE OSOBOWE

Imiona i nazwisko	Paweł, Eugeniusz Antosik
Data i miejsce urodzenia	
Stan cywilny	
Adres domowy	
Obecne stanowisko	Adiunkt w Katedrze Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

### 2. WYKSZTAŁCENIE

1982 – 1987	Państwowe Technikum Weterynaryjne we Wrześni
1987 – 1993	Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, Wydział Weterynarii
1993	Dyplom lekarza weterynarii
2001	Decyzją Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z 26 października 2001 roku tytuł doktora nauk rolniczych w zakresie zootechniki na podstawie pracy pt. „Czynniki wpływające na wylęgowość jaj bażanta łownego <i>Phasianus colchicus</i> L”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Winnickiego.
2008	Dyplom specjalisty w zakresie chirurgii weterynaryjnej

### **3. PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ**

1993 – 2002	Asystent w Katedrze Weterynarii Rolniczej Akademii Rolniczej w Poznaniu
2002 – do chwili obecnej	Adiunkt w Katedrze Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu
2004 – do chwili obecnej	Kierownik „Akademickiej” Przychodni Weterynaryjnej zajmującej się leczeniem i profilaktyką małych zwierząt

## OSIĄGNIĘCIA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

### A. Publikacje naukowe opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

1. Szarek J., Fabczak J., Winnicki S., **Antosik P.**, Janiszewska A., 1997, Zmiany morfologiczne narządów wewnętrznych i mięśni szkieletowych kaczek podczas tuczu na wątroby stłuszczone. Med. Weter., 53, 730-733. **IF<sub>1997</sub>=0, pkt MNiSW=10**

Mój wkład oceniam na 50%, polegał na, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

2. Szarek J., Fabczak J., Winnicki S., **Antosik P.**, Janiszewska A., 1997, Zmiany morfologiczne wątroby kaczek podczas tuczu na wątroby stłuszczone. Med. Weter., 53, 661-664. **IF<sub>1997</sub>=0, pkt MNiSW=10**

Mój wkład oceniam na 50%, polegał na, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

### B. Publikacje naukowe opublikowane w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

1. Książkiewicz J., **Antosik P.**, Piątek D., 1998, Wpływ pochodzenia na współzależności między cechami zewnętrznymi jaj wylęgowych a wybranymi cechami wylężonych z nich kaczek. Roczniki Nauk Zootechnicznych AR Kraków, T, 25.z.2, 37-49. **pkt MNiSW=4**

Mój wkład oceniam na 40%, polegał na zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

2. Książkiewicz J., Kiełczewski K., Winnicki S., **Antosik P.**, Piontek D., 1998, Wpływ masy jaja wylęgowego na masę ciała i inne cechy rozwojowe kaczek z czterech grup zachowawczych, Roczniki Nauk Zootechnicznych AR Poznań, CCCII Zootech. 50. 167-175. **ptk MNiSW=3**

Mój wkład oceniam na 40%, polegał na zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

3. Winnicki S., Olechnowicz J., Turki H., **Antosik P.**, Miara E, 2000, Jakość doju krów w zależności od liczby aparatów udojowych obsługiwanych przez dojarza. Inżynieria Rolnicza, 13, 207-214. pkt MNiSW=3

Mój wkład oceniam na 30%, polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

4. Olechnowicz J., Grudzka–Grzelak E., **Antosik P.**, Winnicki S., 2001, Calcium and Phosphorus level in blood serum of cow during the perinatal period. Folia Universitatis Agriculturae Staniensis, 224 Zootechnica, 42, 135-140. pkt MNiSW=3

Mój wkład oceniam na 40%, polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

5. Winnicki S., Szarek J., **Antosik P.**, Janiszewska A., Baszczyński J., Fabczak J., Wieland E., Tomala H., Skrzydlewski A., Karasiński D, 1995, Tucz kaczek na wątroby o zwiększonej zawartości tłuszczu-fizjologiczny czy patologiczny? Polskie Drobiarstwo, 1, 4-7 i 2, 2-4.

Mój wkład oceniam na 40%, polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

6. Winnicki S., Urbaniak K., **Antosik P.**, 1997, Bezbolesne usuwanie rogów krowom mlecznym. Top Agrar Polska, 9, 92-93.

Mój wkład oceniam na 70%, polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

7. Winnicki S., **Antosik P.**, 1998, Zabiegi pielęgnacyjne u bydła. ODR Piotrowice, 10.

Mój wkład oceniam na 60%, polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, dokumentacji, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

**C. Prace konferencyjne**

1. Winnicki S., Szarek J., **Antosik P.**, Fabczak J., Janiszewska A., Wieland E., Baszczyński J., Tomala H. Profilaktyka tuczu kaczek na wątroby o zwiększonej zawartości tłuszczu (aspekty etologiczne fizjologiczne i anatomopatologiczne). Zagadnienia Dobrostanu Zwierząt. II Ogólnopolska Konferencja, Warszawa 10 listopada 1995, 20 – 23.

*Paweł Antosik*



**OSIĄGNIĘCIA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA****I. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust.2 ustawy**

A. Tytuł: Zastosowanie badań molekularnych w ocenie zdolności rozrodczych świń

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Antosik P.**, Kempisty B., Jackowska M., Piotrowska H., Bukowska D., Woźna M., Lianeri M., Brüssow K.P., Jaśkowski J.M., 2010, Assessment of transcript and protein levels contributing to cell cycle control and gap junction connections in morphologically variable groups of porcine cumulus–oocyte complexes, *Vet. Med-Czech.*, 55, 512-521. **IF<sub>2010</sub>=0,594, pkt MNiSW=25**

Mój wkład oceniam na 75%, polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, wykonaniu dokumentacji, opracowaniu i interpretacji wyników, formułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

2. **Antosik P.**, Kempisty B., Jackowska M., Piotrowska H., Woźna M., Bukowska D., Bryja A., Lianeri M., Brüssow K.P., Jaśkowski J.M., 2011, Are the levels of Cdk4 and Cx43 proteins of porcine oocytes associated with follicular size?, *Anim. Biol.*, 61, 211- 224. **IF<sub>2010</sub>=0,879, pkt MNiSW=25**

Mój wkład oceniam na 75%, polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, wykonaniu dokumentacji, opracowaniu i interpretacji wyników, formułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

3. **Antosik P.**, Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Lianeri M., Brüssow K.P., Woźna M., Jaśkowski J.M., 2010, The morphology of porcine oocytes is associated with *zona pellucida* glycoprotein 3 and integrin beta 2 protein levels, *Vet. Med-Czech.*, 55, 154-162. **IF<sub>2010</sub>=0,594, pkt MNiSW=25**

Mój wkład oceniam na 75%, polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, wykonaniu dokumentacji, opracowaniu i interpretacji wyników, formułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

4. **Antosik P.**, Kempisty B., Bukowska D., Jackowska M., Włodarczyk R., Budna J., Brüssow K.P., Lianeri M., Jagodziński P.P., Jaśkowski JM., 2009, Follicular Size is Associated with the Levels of Transcripts and Proteins of Selected Molecules Responsible for the Fertilization Ability of Oocytes of Puberal Gilts. *J. Reprod. Develop.*, 55, 588-593. **IF<sub>2009</sub>=1,697, pkt MNiSW=30**

Mój wkład oceniam na 65%, polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczenia, wykonaniu dokumentacji, opracowaniu i interpretacji wyników, formułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu.

**C. Opis badań stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust.2 ustawy pt. Zastosowanie badań molekularnych w ocenie zdolności rozrodczych świń****WSTĘP**

Zainteresowanie technikami wspomaganego rozrodu świń w ostatnich kilkunastu latach znacznie wzrosło i jest wyznacznikiem nowych kierunków poszukiwań w tym obszarze. U wielu gatunków zwierząt, w tym także u świń powszechnie stało się stosowanie sztucznej inseminacji. Stosunkowo często wykorzystuje się także technikę zapłodnienia *in vitro* (1,2,3). Wciąż duże nadzieje wiąże się z hodowlą zwierząt transgenicznych i możliwością wykorzystania ich narządów w ksenotransplantacjach. Duża dostępność oraz możliwości szerokiego wykorzystania w biologii rozrodu materiału biologicznego, którym są oocyty głównie bydła i świń sprawia, że poświęca się im szczególną uwagę (4). Jakość komórek jajowych w głównej mierze wpływa na skuteczność dojrzewania, monospermicznego zapłodnienia oraz prawidłową implantację (5,6,7,8). Jednym z kryteriów jakościowej oceny oocytów jest ocena ich zdolności do wzrostu i dojrzewania. Dojrzewanie komórek jajowych jest złożonym procesem, obejmującym wiele przemian biochemicznych i ultrastrukturalnych, które pozwalają na nabycie przez oocyty zdolności do zapłodnienia i zapewnienia zarodkom prawidłowego rozwoju (9,10,11,12). Procesy te polegają na zmianie ułożenia organelli komórkowych (13), separacji chromosomów podczas dojrzewania jądrowego (14), jak i gromadzeniu mRNA, białek oraz czynników transkrypcyjnych (7,10,15). Białka oraz mRNA są niezbędnymi elementami w przebiegu procesu dojrzewania oocytów oraz rozwoju zarodka do stadium ośmio-blastomerowego, po którym u bydła następuje aktywacja genomu zarodkowego i synteza białek (ang. EGA- embryonic genome activation) (16,17,18,19,20). Proces dojrzewania komórek jajowych i osiągnięcie przez nie zdolności do zapłodnienia, a następnie rozwoju zarodka określane są jako kompetencja-potencjał rozwojowy (ang. developmental competence-potency) (17). Obecnie formułuje się trzy hipotezy wyjaśniające niewidoczne morfologicznie różnice w kompetencji rozwojowej oocytów. Pierwsza z nich dotyczy uszkodzenia DNA (21). Druga dotyczy zmian epigenetycznych związanych z niewłaściwym piętnowaniem gametycznym (ang. *imprinting*). Trzecia wskazuje na rolę obecności w komórce jajowej niewystarczającej ilości mRNA i białek, których deficyt nie pozwala na dokończenie procesu dojrzewania cytoplazmatycznego.

Kompetencja rozwojowa oocytów zależna jest od wielu czynników, do których można między innymi zaliczyć przemiany komórkowe i biochemiczne towarzyszące procesom dojrzewania jądrowego i cytoplazmatycznego (10,22). Wzrost, różnicowanie i aktywność steroidowa pęcherzyków jajnikowych regulowane są przez FSH, LH, oksytocynę, prolaktynę oraz hormony steroidowe i białkowe syntetyzowane bezpośrednio w pęcherzyku (23). Do istotnych regulatorów oddziałujących bezpośrednio na oocyt lub oś podwzgórzowo-przysadkową i regulujących czynność jajników zaliczane są także białka z rodziny cytokin oraz hormony metaboliczne (hormon wzrostu, tarczycy, leptyna, glikokortykosteroidy, insulina) (24). Proces oogenezy polega na różnicowaniu się żeńskich pierwotnych komórek linii płciowej w dojrzałe gamety. Najintensywniej przebiega on w fazie diplotenu, w której dochodzi do nagromadzenia zsyntetyzowanych cząstek RNA (mRNA) i białek (25). Matczyny mRNA stanowi matrycę dla puli białek, których ekspresja zachodzi w początkowym stadium rozwoju zarodkowego (25,26). Proces rozwoju oocytów podlega regulacji ze strony ekspresji specyficznych genów. Wiedza na temat profilu transkrypcyjnego i mechanizmów regulujących przebieg tego procesu jest nadal nie wystarczająca. Niektórzy autorzy (27) sugerują, że jakość komórek jajowych i ich zdolność do zapłodnienia zależy od: masy ciała, wieku zwierzęcia, masy jajników, obecności ciałek żółtych, oraz wielkości pęcherzyków jajnikowych lub cyst. Nie mniej ważną rolę w różnicowaniu pęcherzyków jajnikowych, proliferacji oraz adhezji komórek ziarnistych i osłonowych, steroidogenezie, dojrzewaniu oocytów oraz luteinizacji pęcherzyków odgrywa grupa transformujących czynników wzrostu TGF- $\beta$  (TGFB). Jest to grupa cyklin, w której skład wchodzi trzy izoformy TGF- $\beta$  1, 2, 3, hormon antymüllerowski (ang. AMH – anti-Müllerian hormon), dwie inhibiny a i b (INHA, INHB), trzy aktywiny A, B i AB, dwadzieścia białek morfogenetycznych kości (BMP-1-20) oraz dziewięć różnicujących czynników wzrostu (GDF 1-9) (28,29). Poziom dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej oocytów jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na jakość zarodków oraz ich zdolność do prawidłowego rozwoju. Zaburzenie powyższych procesów podczas rozwoju pęcherzyków w jajnikach jest jedną z głównych przyczyn obniżenia zdolności do zapłodnienia i rozwoju zarodka. Dodatkowo, oocyt kontroluje funkcję komórek ziarnistych i osłonowych na drodze lokalnych, wzajemnych sprzężeń zwrotnych. Proces polegający na rozpoznawaniu gamet należy do mechanizmów wykazujących wysoką konserwatywność ewolucyjną. Polega on na rozpoznawaniu przez powierzchniowe receptory związane z plemnikiem,

oligosacharydowych ligandów tworzących strukturę glikoprotein w osłonce przejrzystej. Osłonka przejrzysta komórki jajowej zbudowana jest z trzech do ośmiu glikoprotein. Wszystkie białka osłonki przejrzystej (ang. ZP – *zona pellucida* proteins) posiadają wspólną domenę zbudowaną z 260 aminokwasów, która odgrywa zasadniczą rolę w polimeryzacji glikoprotein ZP do filamentów tworzących powłokę komórki (32,33). Białka te podczas procesu zapłodnienia odpowiadają za interakcję z plemnikami i ochronę komórki jajowej przed polispermia. Osłonka przejrzysta u świni, podobnie jak u innych gatunków ssaków zbudowana jest z glikoprotein, które są kodowane przez trzy główne geny ZP (ZP1, ZP2 ZP3 i/lub ZPA, ZPB, ZPC), (34). W początkowej fazie rozwoju pęcherzyków jajnikowych białka z grupy ZP produkowane są przez oocyt, natomiast w późniejszym etapie w ich syntezie wzrasta udział komórek pęcherzykowych (35). Glikoproteina ZP3 stanowi około 25% osłonki przejrzystej. Bierze ona udział w interakcji plemnika z oocytem poprzez białka wiążące osłonkę (ang. ZBP- *zona pellucida* binding protein) znajdujące się na powierzchni plemnika. Po wnikięciu plemnika do komórki jajowej proteolityczne cięcie cząsteczki ZPA w pozycjach A168 i D169 indukuje szereg reakcji, których efektem jest wyrzucenie do przestrzeni okołozółtkowej zawartości ziaren korowych. Jednocześnie uwalniane zostają enzymy proteolityczne, mające wpływ na zmianę struktury osłonki. Proces ten prowadzi do swoistego usztywnienia osłonki przejrzystej (ang. *zona hardening*) chroniąc komórkę jajową przed polispermicznym zapłodnieniem (blok przeciw polispermii). Glikoproteina ZP2, stanowiąca około 65% masy osłonki przejrzystej ma duże znaczenie w przebiegu przedstawionej reakcji korowej. Natomiast ZP1 jest elementem struktury osłonki, który łączy białka ZP2, ZP3 i jest jej stabilizatorem. Ważnym elementem w procesie nabywania pełnej kompetencji rozwojowej przez oocyty jest osiągnięcie zdolności do dojrzewania (36). Jednym z głównych czynników wpływających na ten proces jest właściwa komunikacja pomiędzy komórkami wzgórka jajonośnego i oocytem. Szlak ten regulowany jest przez specyficzne szczelinowe, jonowo-metaboliczne połączenia komórkowe typu neksus (ang. *gap junction connections*). Za pomocą połączeń szczelinowych przekazywane są jony, między innymi  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , a także cząsteczki o masie nie przekraczającej 1 kDa, na przykład ATP [47,48,49]. Połączenia szczelinowe są wąskimi międzybłonowymi kanałami o średnicy 2-4 nm. Występują prawie we wszystkich tkankach organizmu. Wyróżnia się cztery typy połączeń komunikacyjnych. Połączenia homometryczno-homotopowe zbudowane są z dwóch koneksonów zawierających jeden rodzaj białka. Połączenia homometryczno-heterotypowe są

zbudowane z dwóch koneksonów składających się z różnych białek. W połączeniach heterometryczno-homotypowych z kolei, każdy konekson zbudowany jest z dwóch rodzajów białek. Połączenie heterometryczno-heterotopowe charakteryzuje się największą różnorodnością białkową. Wszystkie te połączenia odpowiadają między innymi za utrzymanie homeostazy tkankowej, międzykomórkową współpracę metaboliczną oraz przekazywanie sygnałów odpowiadających za aktywację procesu apoptozy. Połączenia te zbudowane są ze specyficznych białek należących do grupy koneksyn oraz kinaz zależnych od cyklin (ang. cyclin dependent kinases). Najważniejszą grupą białek, która tworzy połączenia typu neksus są koneksyny (Cx's) (42). U człowieka i myszy poznano odpowiednio 21 i 20 koneksynę o masie cząsteczkowej między 23-62 kDa. Większość koneksyn występuje w wielu rodzajach komórek organizmu. Część koneksyn ze względu na swoją budowę ma zdolność łączenia się z innymi białkami strukturalnymi dzięki czemu są nie tylko podstawowym budulcem połączeń szczelinowych, ale też mogą oddziaływać na niektóre procesy zachodzące w komórce (46,50). Połączenia szczelinowe występują między innymi w kompleksach oocyt-komórki wzgórka jajonośnego. Badania prowadzone od kilkunastu lat, wskazują że niedobór tych białek może powodować zaburzenia w rozwoju oocytów, czyniąc te ostatnie niezdolnymi do zapłodnienia (51,52,53,54,55). Kinazy są enzymami fosforylującymi inne białka w toku przemian komórkowych, jednak Cdk (kinazy cyklino- zależne) pozostają nieaktywne bez aktywacji ze strony cyklin. Poziom kinaz podczas cyklu komórkowego nie zmienia się. Cyklicznym zmianom ulega natomiast poziom cyklin, wytwarzanych w odpowiedzi na czynniki wzrostu. Kinazy zależne od cyklin biorą udział w regulacji cyklu komórkowego. Obecność tych związków wykryto w wielu narządach ssaków, między innymi w mózgu. Zaobserwowano również ich wpływ na proces folikulogenezy i oogenezy (37,38,39,40,41). Cdk1 u ludzi kodowana jest przez gen CDC2 (42). Masa tej kinazy jest niewielka i wynosi około 34 kDa, odgrywa jednak kluczową rolę w cyklu komórkowym. Rajareddy i wsp. (40) badali kilka linii genetycznych myszy. Osobniki pozbawione Cdk1B charakteryzowały się przedwczesną niewydolnością jajników, co dowodziło istotnej roli tej kinazy w kontroli rozwoju jajnika. Cdk5 bierze udział w procesie dojrzewania neuronów. Zaburzenia w syntezie tego enzymu mogą prowadzić do chorób neurologicznych na przykład choroby Alzheimera (43,44). Lee i wsp. (39) sugerują, że kinaza ta pełni istotną rolę w jajniku, biorąc udział w regulowaniu procesu różnicowania się komórek i ich apoptozy (39,46).

Do niedawna kryteria oceny potencjału rozwojowego komórek rozrodczych opierały się jedynie na ich ocenie morfologicznej dokonywanej przy użyciu mikroskopu steroskopowego i uwzględniały następujące cechy:

- strukturę wzgórka jajonośnego (ang. cumulus complex),
- zabarwienie oraz ziarnistość cytoplazmy,
- obecność ciała kierunkowego,
- strukturę przestrzeni periwitelinowej, osłonki przejrzystej,
- obecność wrzeciona podziałowego.

Okazały się one jednak niewystarczające (56,57). Dokładniejsza analiza jakości komórek jajowych i zarodków wymagała wprowadzenia nowocześniejszych molekularnych metod oceny. Jednym z podstawowych testów funkcjonalnych określających stopień dojrzałości oocytów stał się test BCB (ang. brilliant crezyl blue test) (58,59,60). Dokładniejsze określenie potencjału rozwojowego stało się możliwe dzięki zastosowaniu metod molekularnych takich jak genomika i transkryptomika (61,62). Genomika opiera się na przesiewowych badaniach zmian sekwencji genów. Transkryptomika umożliwia analizę całego transkryptomu oocytów i/lub zarodków (8,18,22,25,63,64,65). Technologie proteomiczne zajmują się określeniem potencjału rozwojowego oocytów i zarodków ssaków na podstawie analizy ekspresji poszczególnych białek (66,67,68,69). Z kolei analizowanie profilu mRNA oraz białkowego pozwala na poszukiwanie markerów określających kompetencję oocytów oraz zarodków. Analizy te ułatwiają poszukiwanie korelacji pomiędzy markerami molekularnymi i wybranymi czynnikami zewnętrznymi takimi jak wielkość pęcherzyków jajnikowych, skład płynu pęcherzykowego oraz morfologia kompleksów oocyt-wzgórek jajonośny (ang. COC-cumulus-oocyte complex) (11,16,36,66,70,71,72).

Badanie mechanizmów odpowiadających za regulację folikulo- i oogenezy oraz początkowe stadia rozwoju i implantacji zarodka mają na celu dokładniejsze poznanie procesu nabywania przez gamety żeńskie kompetencji rozwojowej, prawidłowego wzrostu i rozwoju zarodka oraz uzyskania zdrowego potomstwa. Zastosowanie metod badawczych

stosowanych w genetyce molekularnej oraz biologii komórki może w znaczący sposób wpłynąć na rozwój technik wspomaganego rozrodu.

## **CEL**

**1. Określenie związku pomiędzy wielkością pęcherzyków jajnikowych i morfologią oocytów, a poziomem mRNA i białek biorących udział w nabywaniu zdolności do dojrzewania żeńskich gamet u świń.**

**2. Określenie związku pomiędzy wielkością pęcherzyków jajnikowych, morfologią oocytów, a ekspresją genów odpowiedzialnych za interakcję pomiędzy plemnikiem, a oocytem (pZP1, ZP2, pZP3 pZP $\alpha$ , ITGB1, ITGB2) oraz poziomem ekspresji białek glikoprotein osłonki przejrzystej 3 (pZP3) i integryny  $\beta$ 2 (ITGB2).**

## **MATERIAŁ I METODY**

### **Zwierzęta**

W przedstawionych badaniach wykorzystano ogółem 100 dojrzałych płciowo loszek rasy Polska Biała Zwisloucha (PBZ), w wieku od 140 do 180 dni (średnio 160 dni) i masie ciała 95-120 kg (średnio 100 kg). Zwierzęta żywiono paszami standardowymi zależnie od grupy technologicznej. Wszystkie pochodziły z jednego gospodarstwa położonego na terenie Wielkopolski. Do badań klasyfikowano wyłącznie osobniki klinicznie zdrowe. Zwierzęta podawano ubojowi w jednej z lokalnych rzeźni.

### **Pozyskiwanie oocytów**

Jajniki pozyskiwano bezpośrednio po uboju i transportowano w roztworze 0,9 NaCl w temperaturze 38<sup>0</sup>C do laboratorium w czasie nie przekraczającym dwudziestu minut. Następnie umieszczano je w roztworze PBS (ang. Phosphate Buffered saline) z dodatkiem 5% FBS (ang. foetal bovine serum solution), (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Widoczne na powierzchni pęcherzyki klasyfikowano według trzystopniowej skali uwzględniającej pęcherzyki małe (<3 mm), średnie (3-5 mm) i duże (>5 mm).



Kompleksy COCs pobierane były poprzez nakłucie igłą 20G nałożoną na 5ml strzykawkę, następnie przepłukiwane trzykrotnie w zmodyfikowanym PBS z dodatkiem 36/ml pirogronianu, 50/ml gentamycyny 0.5/ml surowicy bydlęcej (ang. BSA-bovine serum albumin). Przy użyciu lupy stereoskopowej komórki liczone i klasyfikowano według skali zaproponowanej przez De Loos et al. (73). Według tej skali wyodrębniono następujące klasy:

- 1- komórki wzgórka jajonośnego mają wiele warstw, ściśle przylegają do siebie i do osłonki przejrzystej, jednorodna ooplazma, brak ziarnistości,
- 2- komórki wzgórka jajonośnego j.w, w ooplazmie widoczne ziarnistości, ciemniejsza strefa w zewnętrznej części oocyty, cały oocyt ciemniejszy i mniej przezroczysty,
- 3- komórki wzgórka jajonośnego mniej ściśnięte, ooplazma nieregularnie zabarwiona z ciemnymi plamami,
- 4- komórki wzgórka jajonośnego rozluźnione, brak spoistości, widoczne zbite ciemne masy komórek, ooplazma nieregularnie zabarwiona i ciemna. W zależności od eksperymentu wykorzystywano oocyty tylko klasy I bądź klasy od I do IV.

#### **Test BCB (ang. brilliant cresyl blue test)**

Przed hodowlą komórki jajowe przepłukiwano dwukrotnie w modyfikowanym DPBS (Dulbeco PBS) z dodatkiem 50IU/ml penicyliny, 50/ml streptomycyny, 0,4% surowicy bydlęcej (BSA), 0,34 mM pirogronianu, 5,5 mM glukozy. Następnie przekładano komórki do 26 $\mu$ M testu BCB, rozpuszczonego w DPBS w temp 38,5<sup>0</sup> C i 5% CO<sub>2</sub> i pozostawiano na 90 minut. Komórki w pełni wybarwione błękitem krezolu (BCB+) przepłukiwano w DPBSm, a następnie przenoszono na płytkę czterodołkową z pożywką NCSU 37 (North Karolina State University Medium).

#### **Hodowla *in vitro* i dojrzewanie oocytów**

Do hodowli *in vitro* przeznaczano oocyty klasy I-IV. Ponadto, pozyskane komórki jajowe pochodziły z pęcherzyków znajdujących się w różnym stadium rozwoju (małe < 3 mm, średnie 3-5 mm, duże > 5 mm). Hodowlę komórkową przeprowadzano w płytkach czterodołkowych firmy Nulcon umieszczając w jednym dołku 50 komórek. Do hodowli używano 500 ml standardowej pożywki TCM-199 (ang. tissue culture medium) (Gibco

NY,USA) z dodatkiem 2,2 mg/ml dwuwęglanu sodu, 0,1 mg/ml pirogronianu sodu, 10 mg/ml BSA, 0,1 mg/ml cysteiny, filtrowany płyn pęcherzykowy świń, 2,5 IU/ml hCG i 2,5 IU/ml eCG. Płytki były przykryte olejem mineralnym, a następnie poddawano hodowli przez 44 godziny w temperaturze 38<sup>0</sup>C z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. Dla oddzielenia komórek wzgórka jajonośnego i komórek ziarnistych kompleksy COC były inkubowane przez dwie minuty w temperaturze 38<sup>0</sup>C z dodatkiem hialuronidazy. Komórki wzgórka usuwano przez worteksowanie w buforze 1% cytrynianu sodu przy użyciu szklanej pipety. W celu potwierdzenia stopnia dojrzałości jądrowej oocyty były barwione barwnikiem DAPI (ang. 4,6-diamino-2-phenyloindol).

### **Obserwacje z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego**

Wyizolowane oocyty pozbawione komórek wzgórka jajonośnego zawieszano w roztworze PBS z dodatkiem 2,5% paraformaldehydu i 0,2% Triton-x-100 i inkubowano 30 minut w temp. pokojowej, a następnie przepłukiwano trzykrotnie w PBS/PVP (ang. polyvinyl pyrrolidone). W celu zablokowania niespecyficznego wiązania próby inkubowano w PBS z 3% BSA i 0,1% Tween 20 przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie oocyty inkubowano 12 godzin w temp 4<sup>0</sup>C w PBS rozcieńczonym 1:500 z BSA 0,15% Tween 20 0,1% z poliklonalnymi przeciwciałami anti-pZP3, anti-Cdk4, anti-Cx43 i poliklonalnymi przeciwciałami anti-ITGB2 (Sanata Cruz, CA, USA). Po kolejnych płukaniach w PBS 0,1% z Tween 20 próby inkubowano z isotiocyanianem fluoresceiny (FITC) sprzężonym z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym przez godzinę w temperaturze pokojowej, w proporcji 1:200 roztworu PBS, Tween 20. Kolejnym etapem po inkubacji było kilkakrotne przepłukanie komórek w mieszaninie PBS z Tween 20. Ostatnim krokiem było przygotowanie preparatu mikroskopowego poprzez zawieszenie oocyty w kropli glicerolu i analiza obrazu pod mikroskopem konfokalnym LSN 510 produkcji Carl ZEISS.

### **Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (RQ-PCR)**

Całkowity RNA izolowano z oocytów przy wykorzystaniu do tego celu zestawu ze złożami krzemionkowymi (Qiagen GmbH, Niemcy). Wyizolowany RNA zawieszano w 20 µl wody wolnej od RNAz i przechowywano w ciekłym azocie do dalszych analiz. Rozmrożone próby RNA traktowano DNAzą I, a następnie przepisywano odwrotnie na cDNA. Reakcję real-time PCR przeprowadzano wykorzystując aparat LightCycler real-time PCR detection

system (Roche Diagnostics GmbH, Monachium, Niemcy) oraz barwnik SYBR<sup>®</sup> Green I. Ilość cDNA była oznaczona wykorzystując względną metodę ilościową. Względny poziom wybranych transkryptów standaryzowano względem poziomu ekspresji dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). W celu amplifikacji, 2 µl cDNA dodawano do 18 µl mieszaniny reakcyjnej (QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR, Master Mix Qiagen GmbH, Niemcy) oraz starterów. Próby RNA bez mieszaniny reakcyjnej stanowiły kontrolę negatywną reakcji. W celu wykazania braku zanieczyszczenia prób RNA z oocytów, RNA pochodzącym z komórek wieńca promienistego, wykorzystano startery specyficzne do aromatazy cytochromu P450 w reakcji RQ-PCR. W celu standaryzacji uzyskanych wyników wykorzystano dwa geny referencyjne w postaci GAPDH i beta-aktyny (ACTB). Dla wykazania integralności wyników oraz w celu potwierdzenia, że GAPDH i ABCT nie zmieniają swojej ekspresji, posłużono się dodatkowym genem referencyjnym w postaci 18S rRNA.

### **Western blotting**

Otrzymany lizat białkowy oocytów poddano elektroforezie w żelu poliakryloamidowym. W ten sposób rozdzielone białka przeniesiono w polu elektrycznym na filtr nitrocelulozowy, gdzie zostały oznaczone komercyjnymi swoistymi przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (HRP), przy pomocy zestawu SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL, USA)). Ilość oznaczanych białek oceniano na podstawie intensywności barwy powstałej w wyniku reakcji peroksydazy chrzanowej ze swoistym dla niej substratem.

### **Analiza statystyczna**

Do opracowania statystycznego wyników użyto jednoczynnikowej analizy wariancji przy wykorzystaniu pakietu ANOVA oraz testu Tukey-a dla porównania ilościowego wyników RQ-PCR. Użyto programu Graph Pad wersji 4.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA). Eksperymenty przeprowadzono dla trzech powtórzeń. Różnice porównywano na poziomie istotności  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  i  $P < 0,001$ .

## Omówienie wyników

Jakość oocytów determinowana jest przez wiele czynników, głównie przez środowisko pęcherzyka jajnikowego i morfologię gamet. Elementy te pozwalają komórce na prawidłowe dojrzewanie, skuteczne zapłodnienie oraz wzrost i rozwój zarodka. W pierwszej pracy oceniono zawartość mRNA kodującego koneksyny i kinazy zależne od cyklin w oocytach różniących się pod względem morfologii (klasy 1-4). Wzrost poziomu badanych transkryptów w oocytach klasy pierwszej w porównaniu do pozostałych klas może sugerować związek pomiędzy morfologią gamet, a ich zdolnością do dojrzewania. W dostępnym piśmiennictwie istnieje niewiele doniesień opisujących rolę koneksyn i kinaz regulujących procesy rozrodu u świń i bydła (74,75,76,77). Sasseville i wsp.(78) wykorzystując model świński wykazali, że koneksyna 43 (Cx43) gromadzona w tratwach lipidowych błony komórkowej odgrywa istotną rolę w otwieraniu międzykomórkowych komunikujących połączeń szczelinowych typu neksus (ang. *gap junction connections*) podczas dojrzewania oocytów u świń. Li i wsp.(79) podają, że Cx43 jest fizjologicznym ekwiwalentem koneksyny 37 (Cx37) i może przejąć jej funkcję komunikacyjną pomiędzy gametami, a otaczającymi komórkami somatycznymi. Badania własne po raz pierwszy w pełni potwierdziły te obserwacje. Uzyskane wyniki sugerują, że Cx43 może być ważnym markerem w ocenie stopnia dojrzałości i kompetencji rozwojowej oocytów świń. Wielu autorów wskazuje także na istotną rolę cyklino-zależnych kinaz białkowych (ang. Cyklin-dependent kinases.Cdk's), szczególnie Cdk5 w regulacji procesu oogenezy i folikulogenezy (38,79,80). Badania wskazały na różną lokalizację w cytoplazmie białka Cdk4 w morfologicznie różnych oocytach. W oocytach klasy pierwszej i drugiej analizowane białko rozmieszczone było w cytoplazmie oocytu peryferyjnie głównie, pod oolemmą. W oocytach klasy trzeciej i czwartej znajdowało się ono w cytoplazmie. Podobne rezultaty uzyskali Kohoutek i wsp. (81), stwierdzając obecność tego białka w jądrze wzrastających oocytów. Sugeruje to, że lokalizacja białka Cdk4 i innych regulatorów cytoplazmatycznych ma związek z dojrzewaniem oocytów. W badaniach własnych po raz pierwszy wykazano różną lokalizację białka Cdk4 w oocytach świń, co może mieć związek z ich jakością oraz osiągnięciem zdolności kompetencji rozwojowej. Rajareddy i wsp. (40) wykazali, że jajniki myszy pozbawione CdkN1 nie miały zdolności do prawidłowego wzrostu i dojrzewania pęcherzykowego. Badania tych autorów dowodzą, że poziom specyficznych transkryptów i

białek może być zależny od jakości oocytów. Białka kodowane przez geny szczelinowych połączeń komórkowych wykazują specyficzną lokalizację w oocytach, zależną od ich jakości. Tak więc poziom ekspresji, jak i specyficznej dystrybucji białek tworzących szczelinowe połączenia komórkowe może być jednym ze wskaźników w ocenie zdolności rozwojowych komórek jajowych u świń. W drugiej pracy analizowano związek pomiędzy poziomem białek cyklino-zależnej kinazy białkowej 4 (Cdk4) i koneksyny 43 (Cx43), a wielkością pęcherzyków jajnikowych świni. Analizując ekspresję białek Cx43 oraz Cdk4 w oocytach izolowanych z dużych (>5 mm), średnich (3-5 mm) oraz małych (<3 mm) pęcherzyków jajnikowych świń, wykazano wyższy poziom ekspresji Cdk4 w oocytach izolowanych z dużych pęcherzyków jajnikowych w porównaniu do pęcherzyków średnich i małych. Przy użyciu mikroskopu konfokalnego wykazano różną lokalizację białka Cdk4 w oocytach. Ponadto, badania te wykazały wyższy poziom ekspresji Cx43 i Cdk4 po dojrzewaniu *in vitro* (IVM). Wyraźna lokalizacja Cdk4 w błonie komórkowej oraz osłonce przejrzystej dotyczyła oocytów pozyskiwanych z dużych pęcherzyków, natomiast w przypadku pęcherzyków średnich i małych przeważała lokalizacja cytoplazmatyczna. Odmienna lokalizacja białka Cdk4 w oocytach pozyskiwanych z pęcherzyków różnej wielkości może wskazywać na obecność specyficznego mechanizmu translokacji tego białka pomiędzy błoną komórkową, osłonką przejrzystą, a cytoplazmą. Różnica w ekspresji może być wynikiem wpływu na formowanie połączeń typu *gap junction* (4,2). W kolejnej pracy wykazano zależność między morfologią oocytów, ich kompetencją rozwojową i poziomem glikoprotein osłonki przejrzystej (pZP1, pZP2, pZP3 i pZP4) i integryny beta2 (ITGB2) odpowiedzialnych za interakcję plemnika z oocytom u świń. Rath i wsp.(82), wskazują, że osłonka przejrzysta przechodzi proces dojrzewania w czasie wzrostu, rozwoju i zapłodnienia komórki jajowej. Fakt ten wskazuje, iż w osłonce przejrzystej zachodzi wiele dynamicznych przemian biochemicznych. W badaniach własnych dowiedziono, że zmiany w morfologii oocytu i osłonki przejrzystej są ściśle skorelowane z ekspresją glikoprotein osłonki przejrzystej. Podobne obserwacje dotyczą ITGB2, której poziom wzrasta wraz z jakością oocytów. Wyższy poziom białek osłonki przejrzystej i beta integryny może być efektem wzrostu syntezy transkryptów i białek w oocytach charakteryzujących się najlepszymi właściwościami morfologicznymi w okresie poprzedzającym zapłodnienie. Ponadto, ekspresja białek odpowiedzialnych za fuzję plemnik-oocyt jest ściśle związana z jakością kompleksów oocyt-komórki wzgórka jajonośnego. Podczas wszystkich stadiów rozwoju pęcherzyków

jajnikowych komórki somatyczne wydzielają wiele czynników wzrostu wpływających na rozwój i dojrzewanie oocytów. Rozmiar pęcherzyka jest jednym z ważniejszych czynników determinujących rozwój oocytów (83,84,85). Iwata i wsp.(86), Kauffold i wsp.(87), Bagg i wsp.(88) wskazują, że oocyty pozyskiwane z dużych i średnich pęcherzyków mają wyższy potencjał rozwojowy w odniesieniu do oocytów pozyskiwanych z pęcherzyków małych. Niewiele natomiast jest prac na temat zdolności do fuzji i zapłodnienia oocytów pozyskiwanych z pęcherzyków różnej wielkości. W kolejnych badaniach obserwowano wzrost poziomu mRNA wszystkich badanych genów w oocytach pozyskiwanych z dużych i średnich pęcherzyków. Wyniki publikowane przez Marchla i wsp.(89) świadczą o tym, iż oocyty pozyskiwane z pęcherzyków o średnicy mniejszej niż trzy milimetry nie osiągają pełnej kompetencji rozwojowej. Ponadto, wykazano, że znaczna liczba tych komórek pozyskiwana z dużych i średnich pęcherzyków ulega skutecznemu zapłodnieniu, a pozyskane w ten sposób zarodki rozwijają się do stadium blastocysty. W oocytach izolowanych z dużych i średnich pęcherzyków wzrasta również poziom steroidów w płynie pęcherzykowym i receptorów dla LH (88). Porównując jakość kompleksów COC zauważono, że komórki z homogeną cytoplazmą i kompletnym kompleksem komórek wzgórka jajonośnego pozyskiwane były z pęcherzyków dużych i średnich. Ekspresja w komórkach wzgórka jajonośnego poprzedza dojrzewanie jądra i jest ważnym wskaźnikiem osiągnięcia przez oocyty wysokiej jakości rozrodczej. Duży wpływ na poziom mRNA ma również płyn pęcherzykowy i suplementy pożywki (90). Wyniki te sugerują, iż pochodzenie oocytów i ich stopień dojrzałości jest regulowany ekspresją analizowanych genów. Badania wskazały również na wzrost poziomu transkryptów kodowanych przez geny odpowiedzialne za interakcje plemnik-oocyt. Obniżony poziom transkryptów w oocytach pozyskiwanych z pęcherzyków o średnicy do 3 mm może wskazywać na obniżoną zdolność do zapłodnienia tych komórek. Obserwacje te mogą być pomocne w kwalifikacji oocytów do zapłodnienia *in vitro* w programie IVP (ang. *in vitro* production) u świń.

**WNIOSKI**

- Poziom ekspresji mRNA i białek kodujących międzykomórkowe połączenia szczelinowe (ang. *gap junction connections*) jest zależny od jakości oocytów i może być jednym z najważniejszych wskaźników oceny zdolności rozwojowej komórek jajowych u świń.
- Białka szczelinowych połączeń komórkowych typu neksus charakteryzują się różną specyficzną lokalizacją w oocytach w zależności od jakości gamet.
- Różna lokalizacja białka Cdk4 w oocytach pozyskiwanych z pęcherzyków różnej wielkości wskazuje na istnienie specyficznego mechanizmu translokacji tego białka pomiędzy błoną komórkową, osłonką przejrzystą, a cytoplazmą.
- Ekspresja genów międzykomórkowych połączeń szczelinowych może mieć wpływ na procesy komunikacyjne pomiędzy komórkami wzgórka jajonośnego, a oocytem.
- Wzrost ekspresji białek osłonki przejrzystej i integryny beta-2 może być efektem zwiększonej syntezy transkryptów i białek w najlepszych jakościowo oocytach.
- Ekspresja białek odpowiedzialnych za fuzję plemnik-oocyt jest ściśle związana z jakością kompleksu komórki wzgórka jajonośnego-oocyt.

**PIŚMIENNICTWO**

1. Hoshi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, 2003, 59, 675-685.
2. Kim M.J., Oh H.J., Park J.E., Hong S.G., Kang J.T., Koo O.J., Kang S.K., Jang G., Lee B.C. Influence of oocyte donor and embryo recipient conditions on cloning efficiency in dogs. *Theriogenology*, 2010, 74, 473-478.
3. Rodríguez-Alvarez L., Cox J., Tovar H., Einspanier R., Castro F.O. Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and in vitro produced embryos. *Zygote*, 2010, 30,1-11.
4. Gajda B. Factors and methods of pig oocyte and embryo quality improvement and their application in reproductive biotechnology. *Reprod. Biol.* 2009, 97-112.
5. Coticchio G., Sereni E., Serrao L., Mazzone S., Iadarola I., Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann. NY Acad. Sci.* 2004, 1034,132-144.
6. Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosińska E., Woźna M., Jagodziński P.P., Jaśkowski J.M. The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 79-85.
7. Krisher R. L. The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 14-23.
8. Patrizio P., Fragouli E., Bianchi V., Borini A., Wells D. Molecular methods for selection of the ideal oocyte. *Reprod. Biomed. Online* 2007, 15, 346-353.
9. Antosik P., Kempisty B., Bukowska D., Jackowska M., Włodarczyk R., Budna J., Brüssow K. P., Lianeri M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M. Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *J. Reprod. Dev.* 2009, 55, 588-593.
10. Kastrop P. M., Bevers M. M., Destrée O. H., Kruip T. A. Protein synthesis and phosphorylation patterns of bovine oocytes maturing in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 29, 271-275.
11. Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J.M., Jagodziński P.P. Assessment of zona pellucida glycoprotein and integrin transcript contents in porcine oocytes. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 71-78.



12. Sirard M. A., Richard F., Blondin P., Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006, 6, 126-136.
13. Hytell P., Xa K. P., Smith S., Greve T. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 1986, 78, 615-625.
14. First N. L., Leibfried-Rutledge M. L., Sirard M. A. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988, 267, 1-46.
15. Gosden R. G.: Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 2002, 186, 149-153.
16. Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Lianeri M., Brussow K.P., Woźna M., Jaśkowski J.M. The morphology of porcine oocytes is associated with *zona pellucida* glycoprotein 3 (pZP3) and integrin beta 2 protein levels. *Vet. Med-Czech.* 2010, 55, 154-162.
17. Duranthon V., Renard J. P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 2001, 55, 1277-1289.
18. Memili E., First N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 2000, 8, 87-96.
19. Misirlioglu M., Page G. P., Sagirkaya H., Kaya A., Parrish J. J., First N. L., Memili E. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2006, 103, 18905-18910.
20. Telford N.A., Watson A. J., Schultz G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 26, 90-100.
21. Cummins J. M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004, 115, 23-29.
22. Krisher R.L. The effect of oocyte quality on development. *J. Anim. Sci.* 2004, 82, 14-23.
23. Madej A., Lang A., Brandt Y., Kindahl H., Madsen M. T., Einarsson S. Factors regulating ovarian function in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2005, 29, 347-361.
24. Knox R. V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2005, 29, 385-397.

25. Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J.M., Jagodziński P.P. Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20, 513-518.
26. Bukowska D., Kempisty B., Antosik P., Jaśkowski J.M., Olechnowicz J. Selected aspects of canine oocytes maturation, fertilization and embryo development in dogs. *Med. Weter.* 2008, 64, 617-736.
27. Bukowska D., Kempisty B., Antosik P., Jackowska M., Woźna M., Lianeri M., Jaśkowski J.M. Association between the number and quality of bitch COC's and selected donor factors. *Med. Weter.* 2010,66, 433-504.
28. Knight P.G., Glister C. Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim. Reprod. Sci.* 2003, 78, 165–183.
29. Massague, J., Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo. J.* 2000, 19, 1745–1754.
30. Hughes D.C. ZP genes in avian species illustrate the dynamic evolution of the vertebrate egg envelope. *Cytogenet. Genome Res.* 2007, 117, 86-91.
31. Spargo S.C., Hope R.M. Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 358-362.
32. Bork, P. A trefoil domain in the rabbit zona pellucida protein. *Protein Sci.* 1993, 2, 669-670.
33. Litscher E.S., Wassarman P.M. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol. Histopathol.* 2007, 22, 337-347.
34. Harris J.D., Hibler D.W., Fontenot G.K., Hsu K.T., Yurewicz E.C, Sacco A.G. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 1994, 4, 361-393.
35. Sinowatz F., Töpfer-Petersen E., Kölle S., Palma G. Functional morphology of the zona pellucida. *Anat. Histol. Embryol.* 2001, 30, 257-263.
36. Antosik P., Kempisty B., Jackowska M., Bukowska D., Woźna M., Lianeri M., Brüssow K.P., Jaśkowski J.M. Assessment of transcripts and protein contents contributing to cell cycle control and gap junction connections in morphologically variable groups of porcine cumulus-oocyte complexes. *Vet. Med.* 2010, 55, 512-521.

37. Font de Mora J, Uren A, Heidarani M, Santos E. Biological activity of p27kip1 and its amino- and carboxy-terminal domains in G2/M transition of *Xenopus* oocytes. *Oncogene*. 1997, 20, 2541-51.
38. Motlik J, Pavlok A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*. 1998, 15, 461-469.
39. Lee K.Y, Rosales J.L, Lee B.C, Chung S.H, Fukui Y, Lee N.S, Lee K.Y, Jeong Y.G, Cdk5/p35 expression in the mouse ovary. *Mol Cells*. 2004, 29, 17-22.
40. Rajareddy S, Reddy P, Du C, Liu L, Jagarlamudi K, Tang W, Shen Y, Berthet C, Peng SL, Kaldis P, Liu K p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol*. 2007, 21(9):2189-202.
41. Dorée M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *Cell Sci*. 2002, 15, 2461-4.
42. Lee M.G, Nurse P Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature*. 1987 7-13, 31-5.
43. Monaco E.A 3<sup>rd</sup>. Recent evidence regarding a role for Cdk5 dysregulation in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2004, 1, 33-8.
44. Jessberger S, Aigner S, Clemenson GD Jr, Toni N, Lie DC, Karalay O, Overall R, Kempermann G, Gage FH. Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus. *PLoS Biol*. 2008 11, 272.
45. Ye Y, Tinari A, Malorni W, Lockshin RA, Zakeri Z. Activation of cyclin-dependent kinase 5 is a consequence of cell death. *Biomed Biotechnol*. 2009:805709
46. Ringuette M.J, Sobieski D.A, Chamow S.M, Dean J. Oocyte-specific gene expression: molecular characterization of a cDNA coding for ZP-3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *PNAS*. 1986, 83, 4341-5.
47. De Maio A, Vega VL, Contreras JE. Gap junctions, homeostasis, and injury. *Cell Physiol*. 2002, 191, 269-82.
48. Kańczuga-Koda L. *Gap* junctions and their role in physiology and pathology of the digestive tract. *PHMD*. 2004, 58, 158-65.
49. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1719, 6-23.

50. Laird D.W. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 2006, 15, 527-43.
51. Mary Jo Carabatsos, Caterina Sellitto, Daniel A. Goodenough, David F. Albertini. Oocyte–Granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic neiotic competence. *Developmental Biology*, 2000, 226, 167–179.
52. Masayuki Shimada, Teruo Maeda, Takato Terada. Dynamic changes of connexin-43, Gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol. of Reprod.* 2001, 64, 1255–1263.
53. Cheryl L. Ackert, Joanne E. I. Gittens, Marilyn J. O’Brien, John J. Eppig, and Gerald M. Kidder. Intercellular Communication via Connexin43 Gap Junin the Mousesctions Is Required for Ovarian Folliculogenesis. *Dev. Biology*, 2001, 233, 258–270.
54. Gittens J. E. I., Kidder G. M. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J. cell Sci.* 2005, 118, 5071-5078.
55. Voizzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P, Nicod P, Germond M, J Haefliger J-A. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytem. *Reproduction*, 2001, 122, 619–628.
56. Lasiene K., Vitkus A., Valanciūte A., Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina (Kaunas)*. 2009, 45, 509-515.
57. Ubaldi F., Rienzi L. Morphological selection of gametes. *Placenta*, 2008, 29, 115-120.
58. Goovaerts I.G., Leroy J.L., Jorssen E.P., Bols P.E. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology* 2010, 74, 1509-1520.
59. Opiela J., Katska-Książkiewicz L., Lipiński D., Słomski R., Bzowska M., Ryńska B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*, 2008, 69, 546-555.
60. Rodrigues B.A., Rodriguez P., Silva A.E., Cavalcante L.F., Feltrin C., Rodrigues J.L. Preliminary study in immature canine oocytes stained with brilliant cresyl blue and obtained from bitches with low and high progesterone serum profiles. *Reprod. Domest. Anim.* 2009, 44, 255-258.
61. Albertini D.F., Sanfins A., Combelles C.M.: Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod.Biomed.* 2003, 6, 410–415.

62. Coticchio G., Sereni E., Serrao L., Mazzone S., Iadarola I., Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality?. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004, 132, 1034-1044.
63. Copp A. J.: Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 1995, 11, 87–93.
64. Rodriguez-Zas S. L., Schellander K., Lewin H. A.: Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 2008 ,135, 129-139.
65. Bachvarova R. F.: A maternal tail of poly(A): the long and short of it. *Cell* 1992, 96, 895–897.
66. Aebersold R., Mann M.: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003, 422, 198-207.
67. Bhojwani M., Rudolph E., Kanitz W., Zuehlke H., Schneider F., Tomek W.: Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during *in vitro* maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning Stem Cells.* 2006, 8, 259-274.
68. Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J.: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004, 4, 3665–3685.
69. Katz-Jaffe M. G, Gardner D. K.: Embryology in the era of proteomics. *Theriogenology*, 2007, 68, 125-130.
70. Antosik P., Kempisty B., Bukowska D., Jackowska M., Włodarczyk R., Budna J., Brüssow K. P., Lianeri M., Jagodziński P. P., Jaśkowski J. M.: Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *J. Reprod. Dev.* 2009, 55, 588-593.
71. Jackowska M., Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Budna J., Lianeri M., Rosińska E., Woźna M., Jagodziński P.P., Jaśkowski J.M.: The morphology of porcine oocytes is associated with zona pellucida glycoprotein transcript contents. *Reprod. Biol.* 2009 ,9, 79-85.
72. Lasiene K., Vitkus A., Valanciūte A., Lasys V.: Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina (Kaunas)* 2009, 45, 509-515.
73. De Loos F., van Maurik P., van BenedenT., Kruip TA. Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1992, 31, 208-214.
74. Shimada M, Maeda T, Terada T. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 2001, 64, 1255–1263.

75. Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, 11, 1–14.
76. Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gerard N, Mermillod P, Goudet G. Effect of growth hormone (GH) on in vitro nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1013–1022.
77. Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanesi E, Lauria A, Gandolfi F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. *Biol. Reprod.* 2004, 70, 465–472.
78. Sasseville M, Gagnon MC, Guillemette C, Sullivan R, Gilchrist RB, Richard FJ. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Molecular Endocrinology*. 2009, 23, 700–710.
79. Li TY, Colley D, Barr KJ, Yee SP, Kidder GM. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *Journal of Cell Science*. 2007, 120, 4117–4125.
80. Font de Mora J, Uren A, Heidarani M, Santos E. Biological activity of p27kip1 and its amino- and carboxy-terminal domains in G2/M transition of *Xenopus* oocytes. *Oncogene*, 1997, 15, 2541–2551.
81. Kohoutek J, Dvorak P, Hampl A. Temporal distribution of CDK4, CDK6, D-type cyclins, and p27 in developing mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 2004, 70, 139–145.
82. Rath D, Topfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology*, 2005, 63, 352–362.
83. Grant SA, Hunter MG, Foxcroft GR. Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 1989, 86, 171–83.
84. Hunter MG, Grant SA, Foxcroft GR. Histological evidence for heterogeneity in the development of preovulatory pig follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1989, 86, 165–70.

85. Wiesak T, Hunter MG, Foxcroft GR. Differences in follicular morphology, steroidogenesis and oocyte maturation in naturally cyclic and PMSG/hCG-treated prepubertal gilts. *J. Reprod. Fertil.* 1990, 89, 633-41.
86. Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction*, 2004, 127, 159-64.
87. Kauffold J, Amer HA, Bergfeld U, Weber W, Sobiraj A. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *J. Reprod. Dev.* 2005, 51, 325-32.
88. Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007, 19, 797-803.
89. Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, 2002, 57, 1523-9.
90. Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. *Mol. Reprod. Dev.* 2006, 73, 1367-79.

*Paweł Antosik*