

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. Zaplanowane kompleksowe badania dostarczą nowych informacji o roli białka AQP1, AQP5 i AQP9 oraz Cx37, Cx43, Cx45 w oocytach oraz komórkach pęcherzyka jajnikowego, przede wszystkim w jakim zakresie powyższe białka wpływają na nabywanie kompetencji rozwojowych przez komórki jajowe. Duże znaczenie będą miały doświadczenia z użyciem inhibitora AQP i Cx, ponieważ badania z tego zakresu mogą stworzyć nowe możliwości opracowania leczenia farmakologicznego. Zastosowanie metod badawczych stosowanych w genetyce molekularnej oraz biologii komórki może w znaczący sposób wpłynąć na rozwój technik wspomaganego rozrodu. Opierając się na naszych wcześniejszych badaniach można założyć następującą hipotezę roboczą, iż aquaporyny i koneksyny uczestniczą w interakcji pęcherzyk-oocyt i mają wpływ na jego jakość. Jednym z głównych celów przedstawionego projektu jest badanie zależności między poziomem ekspresji genów i białka AQP i Cx w dojrzewających oocytach a komórkami otaczającymi oocyt (wzgorzka jajonośnego, ziarnistych i osłonki wewnętrznej).

Cele szczegółowe: 1. Określenie związku pomiędzy wielkością pęcherzyków jajnikowych i morfologią oocytów świni a ekspresją mRNA oraz białek akwaporyn (AQP1, AQP5, AQP9) i koneksyn (Cx37, Cx43 i Cx45); 2. Określenie związku pomiędzy wielkością pęcherzyków jajnikowych i morfologią oocytów świni, a subkomórkową dystrybucją białka AQP1, AQP5 i AQP9 oraz koneksyny 37, 43 i 45 przy zastosowaniu mikroskopii konfokalnej przed i po dojrzewaniu *in vitro*; 3. Poznanie biologicznych powiązań między akwaporynami i koneksynami w rozwoju oocytów przy zastosowaniu inhibitora AQP i Cx; 4. Określenie związku pomiędzy proliferacją komórek ziarnistych, tekalnych oraz komórek wieńca promienistego a wielkością pęcherzyków jajnikowych oraz jakością oocytów świni.

Do badań zostaną wykorzystane jajniki pozyskane poubojowo od dojrzałych płciowo loszek rasy Polska Biała Zwistoucha (PBZ), w wieku od 140 do 180 dni (średnio 160 dni) i masie ciała 95-120 kg (średnio 100 kg). Zwierzęta przeznaczane do badań będą miały znany statut metaboliczny. Do badań klasyfikowane będą wyłącznie osobniki klinicznie zdrowe. Zwierzęta poddane będą ubojowi w jednej z lokalnych rzeźni.

W celu określenia potencjału proliferacyjnego komórek CCs oraz GCs (RTCA), obie populacje będą hodowane przez 168 godz. Komórki do dalszych analiz będą pobierane co 24 godz. Na każdym etapie hodowli pierwotnej populacji komórek określony zostanie indeks proliferacyjny oraz znormalizowany indeks proliferacyjny mierzony wartością impedancji komórek adherentnych. Komórki po hodowli zostaną wykorzystane do dalszych badań tj; RTq-PCR, western-blotting, mikroskopia konfokalna. Powyższym analizom zostaną poddane geny i białka AQP1, AQP5, AQP9, Cx45, Cx43, Cx37.