

**VIII ZJAZD
TOWARZYSTWA BIOLOGII ROZRODU**

PROGRAM I STRESZCZENIA

Olsztyn, 7–9 września 2017 r.

KOMITET ORGANIZACYJNY

dr hab. Monika M. Kaczmarek — Przewodnicząca
dr hab. Anna Korzekwa
dr hab. Aneta Andronowska
dr hab. Agnieszka Blitek
dr Anna Nitkiewicz
prof. dr hab. Zdzisław Gajewski
prof. dr hab. Tomasz Janowski

KOMITET PROGRAMOWY

prof. dr hab. Adam J. Zięcik — Przewodniczący
prof. dr hab. Andrzej Ciereszko
prof. dr hab. Anita Franczak
prof. dr hab. Zdzisław Gajewski
dr Barbara Grzechocińska
prof. dr hab. Tomasz Janowski
dr hab. Monika M. Kaczmarek
prof. dr hab. Marta Kankofer
dr hab. Edyta Molik
prof. dr hab. Wojciech Niżański
dr inż. Ewelina Warzych-Plejer
prof. dr hab. Sławomir Wołczyński

PATRONAT HONOROWY



Prezydent Miasta Olsztyn: Dr inż. Piotr Grzymowicz



Rektor Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie: Prof. dr hab. Ryszard Górecki
Dziekan Wydziału Medycyny Weterynaryjnej: Prof. dr. hab. Bogdan Lewczuk



Założyciel, Wieloletni Dyrektor Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
w Olsztynie, Członek Rzeczywisty PAN: Prof. dr hab. Tadeusz Krzymowski



Dyrektor Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie:
Prof. dr hab. Mariusz Piskula

SPONSORZY



eppendorf



Drogie Koleżanki i Koledzy,

W imieniu Komitetu Organizacyjnego i Programowego serdecznie witamy Państwa na VIII Zjeździe Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR), odbywającym się w Olsztynie w dniach 7–9 września 2017 roku.

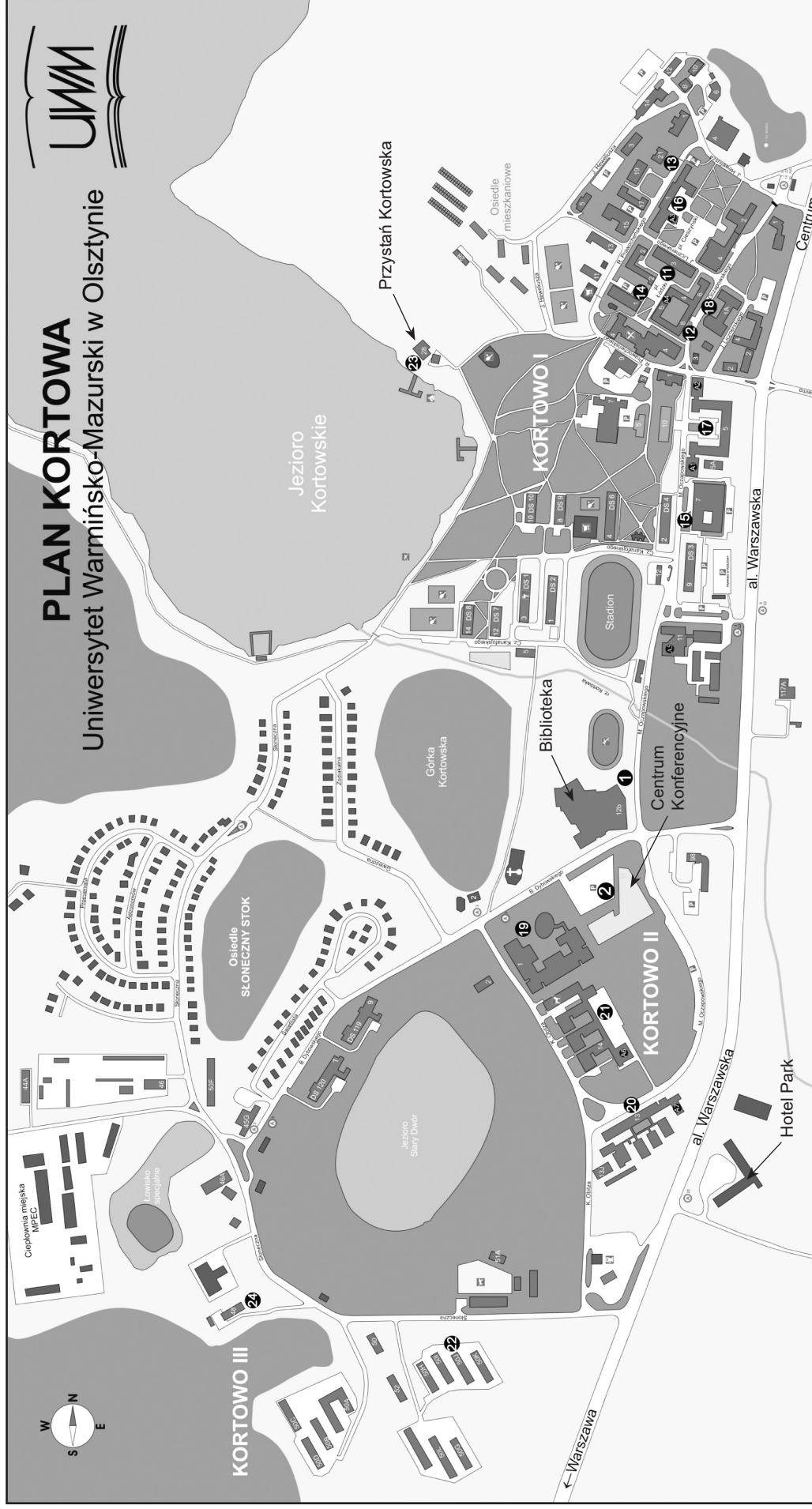
Pierwszy Zjazd TBR miał miejsce 18 lat temu w Mierkach k/Olsztyna. Następne zjazdy odbywały się kolejno w Warszawie, Szczecinie (Międzyzdroje), Krakowie, Wrocławiu, Rzeszowie (Polańczyk) i Toruniu. Wykład inauguracyjny podczas I Zjazdu wygłosił profesor Andrzej Tarkowski, pod jakże znamienitym tytułem „*Co tam Panie w embriologii? Zarodki trzymają się mocno.*”, parafrazując słynny werset z „*Wesela*” Stanisława Wyspiańskiego. W nawiązaniu do miejsca i tematu wystąpienia Profesora, wykład inauguracyjny obecnego VIII Zjazdu TBR postanowiliśmy powierzyć profesor Magdalenie Żernickiej-Goetz (University of Cambridge, UK), byłej doktorantce profesora Tarkowskiego, który tematycznie związany jest z rozwojem zarodka.

Program VIII Zjazdu TBR składa się z wykładów plenarnych, mini-sympozjów dotyczących rozrodu wspomaganego i genetyki niepłodności męskiej oraz obrad w sześciu sesjach związanych z: 1) potencjałem rozwojowym gamet i zarodka, 2) „omiką” w biologii rozrodu, 3) funkcjami jajowodu i jajnika, 4) biotechnikami rozrodu, 5) centralnymi regulacjami w rozrodzie i 6) adaptacjami matka-zarodek/płód. Podczas Zjazdu oprócz wspomnianego wykładu inauguracyjnego zostaną wygłoszone 2 wykłady plenarne, 8 sympozjalnych, 6 otwierających sesje, a także 18 doniesień ustnych oraz przedstawione zostaną 102 postery. Laureatką Nagrody Naukowej im. prof. Władysława Bielańskiego w 2017 roku została dr Joanna Nynca za cykl publikacji po wspólnym tytule „*Identyfikacja i charakterystyka białek układu rozrodczego pstrąga tęczowego w oparciu o metody proteomiczne*”, których najważniejsze osiągnięcia zostaną zaprezentowane podczas trzeciego dnia Zjazdu.

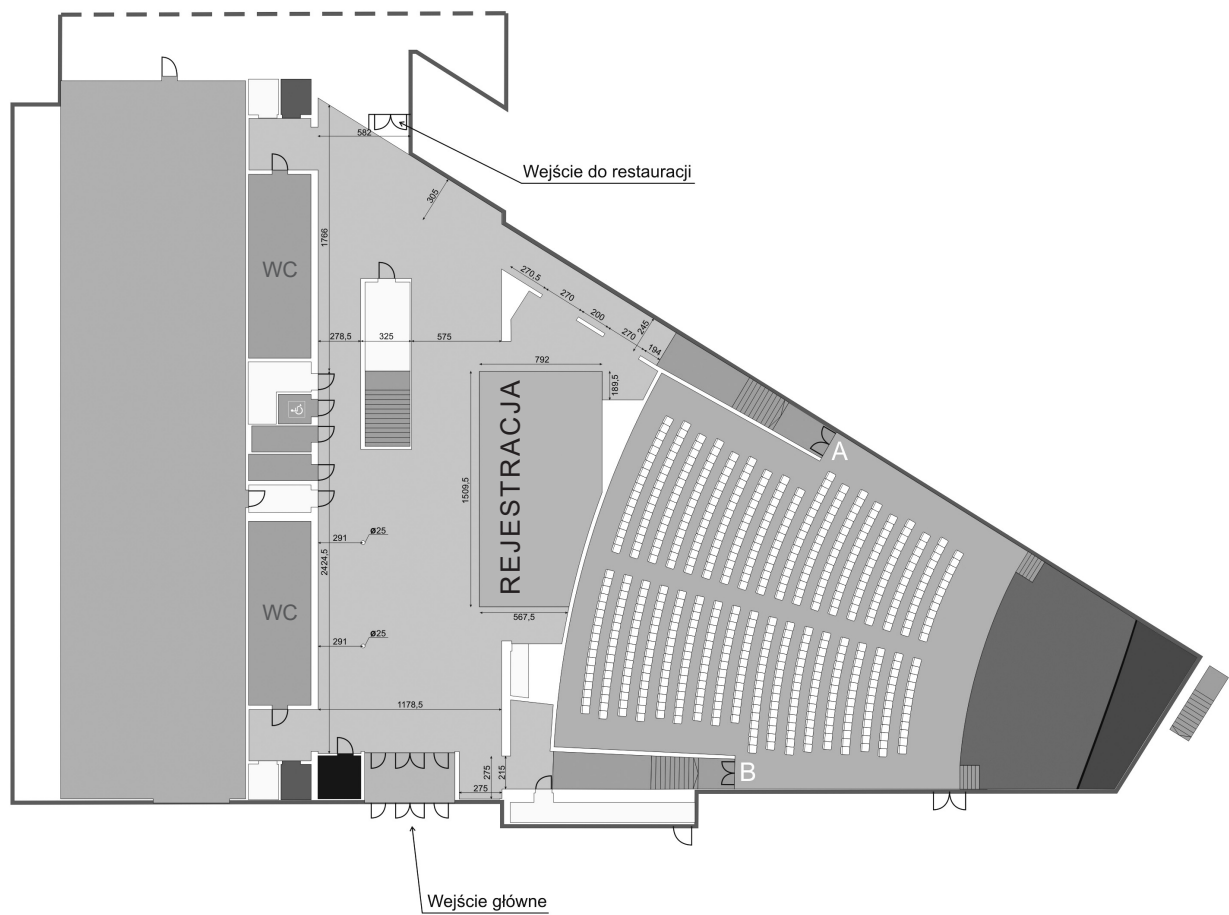
Olsztyński Zjazd TBR daje naszemu środowisku kolejną możliwość dyskusji naukowych, podtrzymania osobistych kontaktów, odnowienia starych przyjaźni oraz poznania nowych obszarów wiedzy w gościnnych murach Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego i stolicy Warmii i Mazur, gdzie żył i pracował Mikołaj Kopernik.

Żywimy nadzieję, że zarówno część naukowa, jak i towarzyska Zjazdu będą dla Państwa stymulujące i przyczynią się do dalszego rozwoju Towarzystwa Biologii Rozrodu.

Monika M. Kaczmarek
Adam J. Zięcik

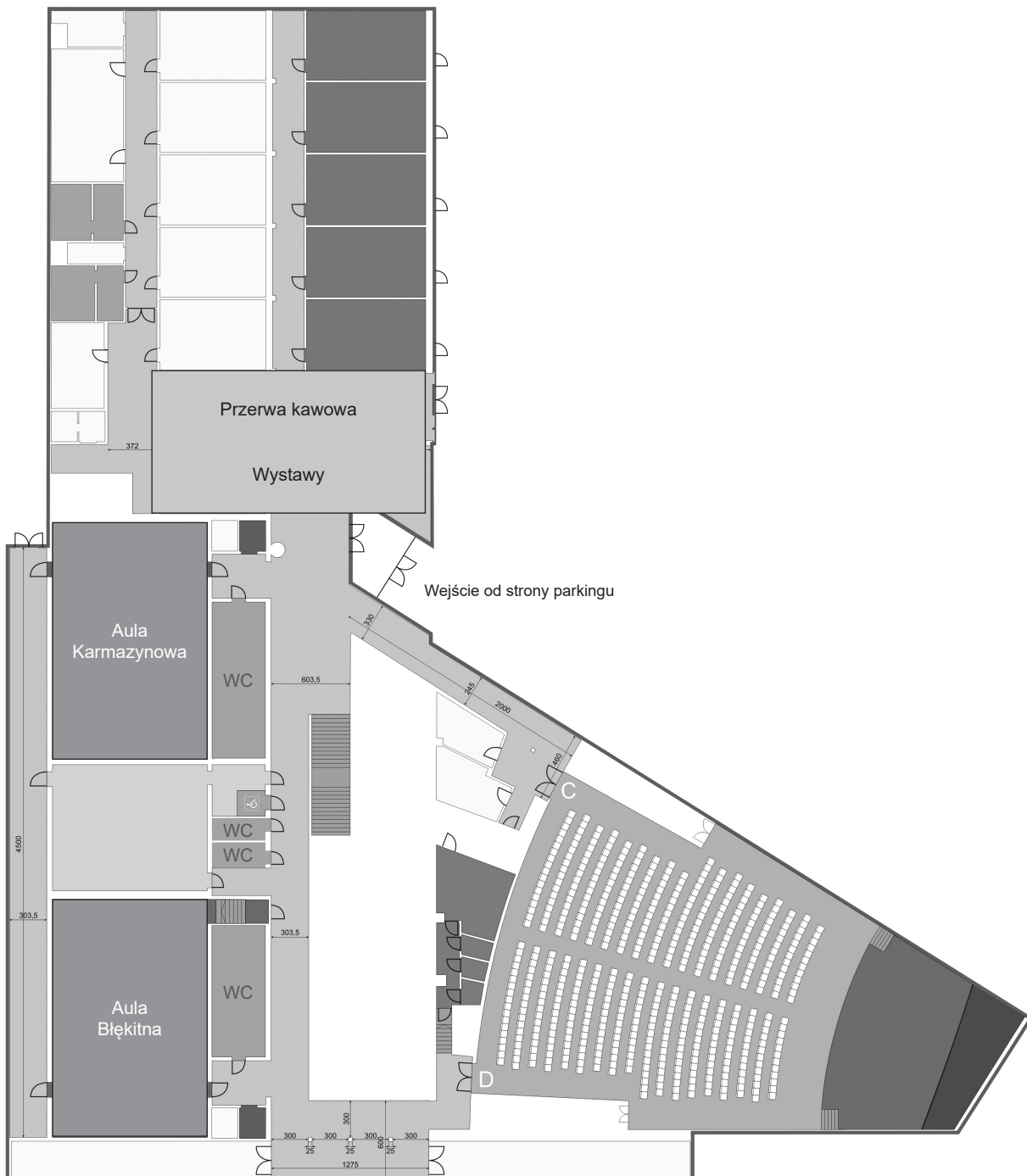
$$\left\{ \begin{array}{l} \text{W} \\ \text{M} \\ \text{I} \\ \text{N} \end{array} \right\}$$


Parter



PLAN CENTRUM KONFERENCYJNEGO

Pierwsze piętro



MIEJSCE ZJAZDU

Centrum Konferencyjne (CK)
Uniwersytetu Warmińsko — Mazurskiego w Olsztynie
ul. B. Dybowskiego 11 (KORTOWO)

WYDARZENIA

Rejestracja	CK, parter
Wykład inauguracyjny	CK, Aula Karmazynowa, I piętro
Spotkanie powitane	CK, Hall, I piętro
Koncert	CK, Aula Błękitna, I piętro
Wykłady plenarne	CK, Aula Błękitna, I piętro
Minisympozja	CK, Aula Karmazynowa, I piętro
Sesja I, sesja III, sesja V	CK, Aula Karmazynowa, I piętro
Sesja II, sesja IV, sesja VI	CK, Aula Błękitna, I piętro
Sesje posterowe	Biblioteka, III piętro
Walne Zgromadzenie Członków TBR	CK, Aula Karmazynowa, I piętro
Obiady	Biblioteka, III piętro, sala 306
Kolacja (piątek, 08.09.2017 r.)	Biblioteka, III piętro, sala 306
Ognisko (sobota, 09.09.2017 r.)	Przystań Kortowska

INFORMACJE O POSTERACH

- Postery można umieszczać na tablicach ustawionych w budynku Biblioteki (III piętro) w następujących terminach: czwartek (07.09.2017) w godz. 18:00–20:00 oraz piątek (08.09.2017) w godz. 8:00–9:00 i w porze obiadu. Wszystkie materiały potrzebne do zawieszenia posterów (taśmy, nożyczki) będą dostępne na miejscu.
- Osoba prezentująca musi stać przy swoim posterze w trakcie Sesji posterowej:
 - 08.09.2017 r. (piątek) w godz. 15:00–16:00: postery o numerach od P_001 do P_055, tematycznie powiązane z Sesjami I–IV;
 - 09.09.2017 r. (sobota) w godz. 14:45–16:00: postery o numerach od P_056 do P_102, tematycznie powiązane z Sesjami V, VI oraz z kategorii INNE.
- Proszę usunąć swoje postery najpóźniej w sobotę (09.09.2017 r.) do godz. 18:00. Pozostawione postery zostaną usunięte przez organizatorów, bez możliwości ich odzyskania.

INFORMACJA DLA WYKŁADOWCÓW I OSÓB GŁOSZĄCYCH

- Prosimy o dostarczenie swoich wykładów/prezentacji na nośniku USB do:
 - biura Zjazdu (Rejestracja) w piątek i sobotę w godz. 8:00–9:00 lub
 - wyznaczonych osób w Auli Błękitnej i Auli Karmazynowej najpóźniej na 30 min. przed planowanym rozpoczęciem właściwych sesji plenarnych i tematycznych.

PROGRAM ZJAZDU

CZWARTEK 07.09.2017	
16:30–21:00	Rejestracja (CENTRUM KONFERENCYJNE)
18:00–18:45	WYKŁAD INAUGURACYJNY (Aula Karmazynowa) <i>The power of partnership: how to build the foundation for the future body?</i> Magdalena Żernicka-Goetz (University of Cambridge, UK)
18:45–19:30	Spotkanie powitalne
19:30–20:30	Koncert — <i>Czerwony Tulipan</i> (Aula Błękitna)
PIĄTEK 08.09.2017	
8:00	Rejestracja (CENTRUM KONFERENCYJNE)
9:00–9:10	CEREMONIA OTWARCIA KONFERENCJI (Aula Błękitna)
9:10–9:50	WYKŁAD PLENARNY (Aula Błękitna) <i>Parent's choice — present trends in human reproduction</i> Grażyna E. Ptak (Malopolska Centre of Biotechnology, Jagiellonian University, Cracow; IGAB PAS, Poland)
9:50–10:20	Przerwa kawowa (CENTRUM KONFERENCYJNE)
10:20–12:05	MINISYMPOZJUM I (Aula Karmazynowa) <i>Safety evaluation in Assisted Reproduction Technologies</i>
10:20–10:55	<i>Epigenetic effects of parental factors and assisted reproductive technologies on the next generation</i> Thomas Haaf (Institute for Human Genetics, University of Wuerzburg, Germany)
10:55–11:30	<i>ART technologies and safety: update</i> Laura Rienzi (Genera, Centre for Reproductive Medicine, Roma, Italy)
11:30–12:05	<i>Identification of novel markers of human oocyte aging via non — invasive RNA sequencing analysis of cummulus cells</i> Pasquale Patrizio (Yale Fertility Center, Yale School of Medicine, USA)
12:10–13:25	SESJE RÓWNOLEGŁE
SESJA I. <i>Developmental potential of gametes and embryos</i> (Aula Karmazynowa)	SESJA II. <i>Omics tools in reproductive biology</i> (Aula Błękitna)
WYKŁADY OTWIERAJĄCE	
12:10–12:40	
<i>High quality oocytes and embryos — the key to reproductive success in domestic animals</i> Dorota Cieślak & Izabela Woławek-Potocka (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu & Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn)	<i>How omics tools can advance research in reproductive biology?</i> Mariola Dietrich & Monika M. Kaczmarek (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn)
PREZENTACJE USTNE	
12:40–12:55	
<i>Tracing mouse embryonic stem cells fate in environment of early developing embryo with iPLEX MALDI-TOF mass spectrometry</i> Agnieszka Bernat-Wójtowska (Uniwersytet Gdański & Gdański Uniwersytet Medyczny)	<i>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the expression of genes involved in TGF-β/BMP signaling pathway in porcine granulosa cells</i> Anna Nynca (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)
12:55–13:10	
<i>The development of methodology to examine human semen plasma microvesicles by flow cytometry</i> Michał Bochenek (Instytut Zootechniki PIB w Balicach)	<i>Identification and characterization of long non-coding RNAs in porcine granulosa cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin</i> Monika Ruszkowska (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)

13:10–13:25	
<i>Prostaglandin F2α (PGF2α) synthesis and action in preimplantation bovine embryos obtained from oocytes of good and poor quality</i> Katarzyna Grycmacher (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie)	<i>Seasonal changes in bull semen proteome</i> Błażej Westfalewicz (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie)
13:25–15:00	Przerwa obiadowa (BIBLIOTEKA)
15:00–16:00	SESJA POSTEROWA (BIBLIOTEKA)
16:00–17:15	SESJE RÓWNOLEGŁE (CENTRUM KONFERENCYJNE)
SESJA III. <i>Oviductal and ovarian function</i> (Aula Karmazynowa)	SESJA IV. <i>Biotechniques in reproduction</i> (Aula Błękitna)
WYKŁAD OTWIERAJĄCY	
16:00–16:30	
<i>Rola chemokin i komórek immunologicznych w funkcji ciała żółtego</i> Aneta Andronowska (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn)	<i>Możliwości zastosowania technik wspomaganego rozrodu w ratowaniu populacji ssaków i ryb zagrożonych wyginięciem</i> Andrzej Ciereszko & Wojciech Niżański (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn & Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu)
PREZENTACJE USTNE	
16:30–16:45	
<i>The expression of the immune system genes is affected by the presence of the embryos in the porcine oviductal isthmus</i> Marcin Martyniak (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)	<i>Uzyskanie wczesnej blastocysty żubra w warunkach in vitro</i> Anna M. Duszewska (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
16:45–17:00	
<i>Folliculogenesis in the neonatal pig ovaries affected by endocrine active compounds (EACs)</i> Maria Słomczyńska (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie)	<i>Characteristics of cauda epididymal spermatozoa of red deer (Cervus Elaphus L.) during the rutting season — analysis of sperm kinematic motility parameters and activity of selected antioxidant enzymes</i> Karolina Wasilewska (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)
17:00–17:15	
<i>miRNA-mRNA interactions in the porcine corpus luteum during early pregnancy in pigs</i> Emilia Przygodzka (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie)	<i>Ekspresja genów związanych z apoptozą w tkance jądrowej kota domowego (Felis catus) w aspekcie sezonowości i morfologii nasienia</i> Sylwia Prochowska (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu)
17:15–17:45	Przerwa kawowa (CENTRUM KONFERENCYJNE)
17:45–19:30	Walne Zgromadzenie członków TBR (Aula Karmazynowa)
20:30–23:00	Kolacja (BIBLIOTEKA)
SOBOTA 09.09.2017	
8:00	Rejestracja (CENTRUM KONFERENCYJNE)
9:00–9:40	WYKŁAD PLENARNY (Aula Błękitna) <i>The role of Y chromosome in directing spermatogenesis</i> Monika A. Ward (University of Hawaii, USA)

9:40–10:20	WYKŁAD laureatki Nagrody BIELAŃSKIEGO (Aula Błękitna)	
10:20–10:50	Przerwa kawowa (CENTRUM KONFERENCYJNE)	
10:50–13:10	MINISYMPOZJUM II (Aula Karmazynowa) <i>Genetics in male infertility</i>	
10:50–11:05	<i>Novel genes and diagnostic/prognostic trends in azoospermia — PART I</i> Maciej Kurpisz (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Dept. of OBGYN and Reproductive Science, University of Pittsburgh, USA)	
11:05–11:40	<i>Novel genes and diagnostic/prognostic trends in azoospermia — PART II</i> Alexander Yatsenko (Dept. of OBGYN and Reproductive Science, University of Pittsburgh, USA)	
11:40–12:10	<i>Reciprocal chromosome translocations (RCTs) — the most frequent structural aberrations in infertile men</i> Marta Olszewska (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan)	
12:10–12:40	<i>Identification and the role of sperm mRNA among molecular reasons of male infertility</i> Magdalena Depa-Martynów (COOK Medical, Polska)	
12:40–13:10	<i>Proteomic identification of sperm antigens involved in immunological infertility</i> Karolina Nowicka-Bauer (Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan)	
13:10–14:45	Przerwa obiadowa (BIBLIOTEKA)	
14:45–16:00	SESJA POSTEROWA (BIBLIOTEKA)	
16:00–16:30	Przerwa kawowa (BIBLIOTEKA)	
16:30–17:45	SESJE RÓWNOLEGŁE (CENTRUM KONFERENCYJNE)	
SESJA V. <i>Central regulations of reproduction</i> (Aula Karmazynowa)		SESJA VI. <i>Maternal-embryo/fetus adaptations</i> (Aula Błękitna)
WYKŁADY OTWIERAJĄCE		
16:30–17:00		
<i>Endogenne kanabinoidy a regulacja sekrecji GnRH/LH</i> Dorota Tomaszewska-Zaremba (Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN, Jabłonna)		<i>Tajemnice łożyska</i> Marta Kankofer (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie)
PREZENTACJE USTNE		
17:00–17:15		
<i>In vitro effect of NPY on basal and GnRH-induced LH secretion from pituitary cells during early pregnancy in the pig</i> Hubert Buchowski (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)		<i>Expression of selected genes and proteins in monocultures of different placenta cell lines and their co-cultures with adrenal H295R cells, reflecting in vitro fetoplacental unit</i> Eliza Drwal (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie)
17:15–17:30		
<i>Zmiany dzień/noc oraz wpływ stanu zapalnego na sekrecję gonadotropin i ekspresję receptora GnRH w guzowej części przysadki owcy</i> Karolina Wojtulewicz (Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonce)		<i>Wpływ miR-125b na ekspresję wybranych genów docelowych w komórkach trofoblastu świni</i> Joanna Najmuła (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie)
17:30–17:45		
<i>Czy neurotransmisja sygnału światła w podwzgórz samca mieszańca świni domowej i dzika może być modulowana poprzez endogenne tlenek węgla?</i> Przemysław Gilun (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie)		<i>The influence of restricted nutrition of female in periconceptional period on the level of DNA methylation of the endometrium during the implantation</i> Kamila Zglejc (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)
17:45–18:00	CEREMONIA ZAMKNIĘCIA KONFERENCJI (AULA BŁĘKITNA)	
19:30	Ognisko (PRZYSTAŃ KORTOWSKA)	

SPIS TREŚCI

WYKŁAD INAUGURACYJNY

The power of partnership: how to build the foundation for the future body? <i>Zernicka-Goetz M.</i>	23
---	----

WYKŁADY PLENARNE

Parent's choice — present trends in human reproduction <i>Ptak G.E.</i>	27
The role of Y chromosome in directing spermatogenesis <i>Ward M.A.</i>	29

MINISYMPOZJUM II

Nowe geny i perspektywy diagnostyczno-prognostyczne w azoospermii — cz. I <i>Kurpisz M., Malcher A., Yatsenko A.N.</i>	33
Novel genes and diagnostic/prognostic trends in azoospermia — PART II <i>Yatsenko A.N., Pollock N., Huaiyang J., Yatsenko S.A., Rajkovic A., Tomas J., Sanfilippo J., Olszewska M., Kurpisz M.</i>	34
Reciprocal chromosome translocations (RCTs) — the most frequent structural aberrations in infertile men <i>Olszewska M., Wiland E., Huleyuk N., Yatsenko A.N., Chernykh V.B., Zastavna D., Midro A.T., Kurpisz M.</i>	35
Identification and the role of sperm mRNA among molecular reasons of male infertility <i>Depa-Martynów M., Jędrzejczak P.</i>	36
Proteomic identification of sperm antigens involved in immunological infertility <i>Nowicka-Bauer K., Kamieniczna M., Kurpisz M.</i>	37

WYKŁADY OTWIERAJĄCE I PREZENTACJE USTNE W SESJACH

High quality oocytes and embryos — the key to reproductive success in domestic animals <i>Boruszewska D., Grycmacher K., Cieślak D., Kowalczyk-Zięba I., Madeja Z.E., Orsztynowicz M., Pawlak P., Pers-Kamczyc E., Sinderewicz E., Staszkiwicz J., Warzych E., Woławek-Potocka I.</i>	41
Tracing mouse embryonic stem cells fate in environment of an early developing embryo with iPLEX MALDI-TOF mass spectrometry <i>Bernat A., Aksoy I., Bielawski K.P., Savatier P.</i>	42
The development of methodology to examine human semen plasma microvesicles by flow cytometry <i>Bochenek M., Trzcińska M., Gogol P., Czerniecki J., Ptak G.E.</i>	43
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF$_{2\alpha}$) synthesis and action in preimplantation bovine embryos obtained from oocytes of good and poor quality <i>Grycmacher K., Boruszewska D., Sinderewicz E., Kowalczyk-Zięba I., Staszkiwicz J., Woławek-Potocka I.</i>	44
How omics tools can advance research in reproductive biology? <i>Dietrich M.A., Kaczmarek M.M.</i>	45

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin affects the expression of genes involved in TGF-β/BMP signaling pathway in porcine granulosa cells	
Nynca A., Sadowska A., Pauksztó L., Orlowska K., Ruszkowska M., Swigonska S., Molcan T., Ciereszko R.E.	46
Identification and characterization of long non-coding RNAs in porcine granulosa cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin	
Ruszkowska M., Pauksztó L., Nynca A., Sadowska A., Orlowska K., Swigonska S., Molcan T., Jastrzebski J.P., Ciereszko R.E.	47
Seasonal changes in bull semen proteome	
Westfalewicz B., Dietrich M.A., Mostek A., Słowińska M., Judycka S., Ciereszko A.	48
Rola chemokin i komórek immunologicznych w funkcji ciała żółtego	
Andronowska A., Witek K.J., Zięcik A.J.	49
The expression of the immune system genes is affected by the presence of the embryos in the porcine oviductal isthmus	
Martyniak M., Franczak A., Kotwica G.	50
Folliculogenesis in the neonatal pig ovaries affected by endocrine active compounds (EACs)	
Słomczyńska M., Knapczyk-Stwora K., Grzesiak M., Czaja E., Witek P., Koziorowski M., Nynca A., Ciereszko R.E., Jastrzebski J.P.	51
miRNA-mRNA interactions in the porcine corpus luteum during early pregnancy	
Przygodzka E., Myszczyński K., Sokołowska G., Kaczmarek M.M.	52
Możliwości zastosowania technik wspomaganego rozrodu w ratowaniu populacji ssaków i ryb zagrożonych wyginięciem	
Niżański W., Ciereszko A.	53
Uzyskanie wczesnej blastocysty żubra w warunkach <i>in vitro</i>	
Duszeńska A.M., Gręda P., Baraniewicz M., Bielecki W., Niżański W., Partyka A., Tracz M., Nowak Z., Chelmońska-Soyta A., Olech W.	54
Characteristics of cauda epididymal spermatozoa of red deer (<i>Cervus Elaphus</i> L.) during the rutting season — analysis of sperm kinematic motility parameters and activity of selected antioxidant enzymes	
Koziorowska-Gilun M., Dziekońska A., Wasilewska K., Kordan W.	55
Ekspresja genów związanych z apoptozą w tkance jądrowej kota domowego (<i>Felis catus</i>) w aspekcie sezonowości i morfologii nasienia	
Prochowska S., Partyka A., Niżański W.	56
Endogenne kanabinoidy a regulacja sekrecji GnRH/LH	
Tomaszewska-Zaremba D.	57
In vitro effect of NPY on basal and GnRH-induced LH secretion from pituitary cells during early pregnancy in the pig	
Siawrys G., Buchowski H., Bogacka I.	58
Zmiany dzień/noc oraz wpływ stanu zapalnego na sekrecję gonadotropin i ekspresję receptora GnRH w guzowatej części przysadki owcy	
Wojtulewicz K., Tomaszewska-Zaremba D., Krawczyńska A., Herman A.P.	59
Czy neurotransmisja sygnału światła w podwzgórzu samca mieszańca świni domowej i dzika może być modulowana poprzez endogenne tlenek węgla?	
Gilun P., Lewicka M., Wąsowska B., Koziorowska-Gilun M., Kozioł K., Koziorowski M.	60
Tajemnice łożyska	
Kankofer M.	61
Expression of selected genes and proteins in monocultures of different placenta cell lines and their co-cultures with adrenal H295R cells, reflecting <i>in vitro</i> fetoplacental unit	
Drwal E., Rak A., Gregoraszczuk E.Ł.	62
Wpływ miR-125b na ekspresję wybranych genów docelowych w komórkach trofoblastu świni	
Najmucha J., Nitkiewicz A., Kaczmarek M.M.	63
The influence of restricted nutrition of female in periconceptional period on the level of DNA methylation of the endometrium during the implantation	
Zglejc K., Marciniak M., Waszkiewicz E., Kotwica G., Franczak A.	64

PREZENTACJE POSTEROWE

Lineage-specific transcription factors expression during development of trophectoderm in rabbit embryos <i>Barłowska K., Madeja Z.E., Pawlak P., Piliszek A.</i>	67
Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E₂ in the early and late cleaved bovine embryos at different stages of preimplantation development <i>Boruszewska D., Grycmacher K., Kowalczyk-Zięba I., Sinderewicz E., Staszkiwicz J., Wocławek-Potocka I.</i>	68
Zróżnicowanie dystrybucji selenu i obrazu morfologicznego plemników: porównanie głowy, trzonu i ogona najądrzy dzików (<i>Sus scrofa</i> L.) <i>Gączarzewicz D., Udała J., Bąkowska M., Pilarczyk B., Tomza-Marciniak A., Błaszczuk B., Stankiewicz T., Piasecka M.</i>	69
Influence of the prostatic fluid on spermatozoa recovery from the canine cauda epididymis and its survival at 4°C — preliminary results <i>Młynarczyk A., Konieczna K., Kochan J., Nowak A., Młodawska W.</i>	70
Bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and follicle-stimulating hormone (FSH) in the dominant and atretic ovarian follicles of cows <i>Mościcki W., Błaszczuk B., Stankiewicz T., Udała J., Gączarzewicz D.</i>	71
The apoptosis in parthenogenetic blastocysts of pig and cattle <i>Pawlak P., Madeja Z.E., Lechniak-Cieślak D., Warzych E.</i>	72
Follicular fluid during <i>in vitro</i> maturation of porcine oocytes affects the yield, quality and gene expression of day-7 parthenogenetic blastocysts <i>Pawlak P., Warzych E., Maciejewska E., Madeja Z.E., Lechniak-Cieślak D.</i>	73
Mechanism of epiblast and primitive endoderm differentiation in preimplantation rabbit embryos <i>Piliszek A., Madeja Z.E., Pawlak P., Grabarek J., Plusa B.</i>	74
Wpływ saponin na morfologię nabłonka przewodu najądrza szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną <i>Rzeszutek S., Misiakiewicz-Has K., Pilutin A., Kolasa-Wołosz A., Wiszniewska B.</i>	75
Waiting for sperm does not pay off. Effects of postovulatory aging on developmental potential of mouse oocytes <i>Sabat D.K., Szpila M., Kielbasa A., Brouze M., Przychodzka A., Prokurat K., Szczepańska K., Ajduk A.</i>	76
Ekspresja kwasu lizofosfatydowego (LPA) oraz markerów jakości oocyty w kompleksach oocyt-komórki wzgórka jajonośnego u krowy zależy od rodzaju pęcherzyka jajnikowego <i>Sinderewicz E., Staszkiwicz J., Grycmacher K., Boruszewska D., Kowalczyk-Zięba I., Wocławek-Potocka I.</i>	77
Morphokinetic analysis of preimplantation mouse embryo development by Time Lapse Monitoring (TLM) as a new animal model for experimental embryology <i>Sokołowski G., Faundez R., Niwińska A., Sandowska-Markiewicz Z., Gajewska M., Świderek W., Woszczyński M., Wójcik-Trechcińska U., Ostrowski J., Gajewski Z.</i>	78
Influence of the oxygen level and protein components on differentiation of first cell lines in rabbit preimplantation embryos during <i>in vitro</i> culture <i>Stachowiak A., Modliński J.A., Duszewska A.M., Gręda P., Piliszek A.</i>	79
Apoptosis in preimplantation mouse embryos: analysis of the possible inducing factors <i>Winiarczyk D., Modliński J.A., Piliszek A.</i>	80
Ultrastructural analysis of spermiogenesis in myosin VI-deficient mice <i>Zakrzewski P., Rędownicz M.J., Buss F., Lenartowska M.</i>	81
The influence of pluripotency state of mouse ESCs on their ability to produce chimaeras <i>Żyżyńska-Galeńska K., Modliński J.A., Piliszek A., Savatier P., Bernat A.</i>	82
Proteomic analysis of sperm proteins related to the freezability of carp semen <i>Dietrich M.A., Irnazarow I., Karol H., Liszewska E., Ciereszko A.</i>	83
Proteomic analysis of non-phosphorylcholine-binding and phosphorylcholine-binding proteins of canine seminal plasma <i>Mogielnicka-Brzozowska M., Słowińska M., Fraser L., Wysocki P., Strzeżek R., Wasilewska K., Kordan W.</i>	84

Differences in the binding selectivity between 2,7-dichlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin and its metabolite to the porcine CYP1A1 enzyme	
Molcan T., Swigonska S., Nynca A., Sadowska A., Ruszkowska M., Orlowska K., Ciereszko R.E.	85
Cryopreservation of carp semen triggers oxidation of spermatozoa proteins	
Mostek A., Słowińska M., Judycka S., Karol H., Ciereszko A., Dietrich M.A.	86
The effects of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin (TCDD) on the proteome of porcine granulosa cells	
Orlowska K., Swigonska S., Sadowska A., Ruszkowska M., Nynca A., Molcan T., Ciereszko R.E.	87
The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-<i>p</i>-dioxin on the transcriptome of porcine granulosa cells	
Sadowska A., Nynca A., Pauksztó L., Ruszkowska M., Orlowska K., Swigonska S., Molcan T., Jastrzebski J.P., Ciereszko R.E.	88
The changes in the proteome profile of porcine granulosa cell line (AVG-16) during culture time	
Swigonska S., Orlowska K., Kunicka Z., Sadowska A., Ruszkowska M., Nynca A., Molcan T., Ciereszko R.E.	89
Effects of fibroblast growth factor 2 (FGF2) on genes expression related to steroidogenesis and angiogenesis and its interactions with prostaglandin F2α (PGF) in the bovine corpus luteum (CL) depend on the stage of estrous cycle	
Jończyk A.W., Piotrowska-Tomala K.K., Łukasik K., Skarżyński D.J.	90
Effect of gonadotropin and steroid hormones on expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in porcine ovarian follicles; <i>in vitro</i> study	
Kurowska P., Rak A.	91
Analiza proteomu ciała żółtego podczas luteolizy i wczesnej ciąży u świni	
Likszó P., Jalali B.M., Skarżyński D.J.	92
Wpływ chronicznego degeneracyjnego zwyrodnienia błony śluzowej macicy na funkcje wydzielnicze i profil ekspresji genów w ciałku żółtym (CL) kłacz	
Łukasik K., Skarżyński D.J.	93
Influence of injection administration of royal jelly during estrus synchronization with fluorogestone acetate on ovarian function and reproductive performance of ewes	
Murawski M., Patkowski K., Schwarzw T., Szymanowska A., Grygier J., Gruszecki T., Greguła-Kania M., Borsuk G., Olszewski K., Bartlewski P.M.	94
The involvement of hypoxia and HIF1A in molecular processes determining luteal function maintenance in pigs	
Przygrodzka E., Myszczyński K., Zięćik A.J.	95
The effect of prostaglandin E₂ on molecular changes occurring in the porcine corpus luteum during early pregnancy	
Przygrodzka E., Waclawik A., Zięćik A.J.	96
Częściowa metylacja promotorów izoform PGRA i PGRB receptora progesteronu w układzie rozrodczym krowy	
Rekawiecki R., Kowalik M.K., Kisielewska K., Kotwica J.	97
Expression of apelin and apelin receptor (APJ) in porcine corpus luteum cells and effect of apelin on progesterone secretion	
Różycka M., Grzesiak M., Kurowska P., Rame C., Dupont J., Rak A.	98
Effect of nitrophenols on steroidogenesis in prehierarchical ovarian follicles of the hen (<i>Gallus domesticus</i>)	
Sechman A., Grzegorzewska A.K., Grzesiak M., Karpeta A., Katarzyńska-Banasik D., Kowalik K., Hrabia A.	99
Kwas lizofosfatydowy (LPA) moduluje funkcje bańki jajowodu w okołooowulacyjnej oraz wczesnolutealnej fazie cyklu rujowego u krowy	
Sinderewicz E., Boruszevska D., Grycmacher K., Kowalczyk-Zięba I., Staszkievicz J., Wocławek-Potocka I.	100
Characterization and differentiation of porcine ovarian putative stem cells into neuronal-like cells	
Wartalski K., Gorczyca G., Duda M.	101
Leptin signaling activation mediates ovarian pathology in diet-induced obesity mice	
Wołodko K., Adamowski M., Skarżyński D.J., Galvao A.M.	102
Motion characteristics and membrane integrity of boar spermatozoa differing in freezability	
Fraser L., Zasiadczyk Ł., Wasilewska K., Filipowicz K., Karpiesiuk K.	103
Effect of thymosin on survival of vitrified porcine oocytes	
Gajda B., Poniedziałek-Kempny K., Rajska I., Smorąg Z.	104

Wpływ cytoplazmy selektywnie enukleowanych zygot na morfologię przeszczepionych jąder komórkowych <i>Gręda P., Kruś J., Duszewska A.M., Piliszek A., Modliński J.A.</i>	105
Blastomere removal from cleaving mouse embryos affects long-term predisposition to obesity in adult males <i>Kotlarska M., Pęczkowicz-Szyska J., Florek W., Stankiewicz A.M., Arena R., Starzyński R.M., Sampino S., Modliński J.A.</i>	106
The influence of motility stimulants on biological properties of cryopreserved dog semen <i>Lecewicz M., Strzeżek R., Majewska A., Kordan W.</i>	107
Effect of addition of a low molecular weight antioxidants to the diluent for freezing semen of the dog on selected quality parameters of cryopreserved spermatozoa <i>Lecewicz M., Strzeżek R., Majewska A., Kordan W.</i>	108
Tworzenie Banku Nasienia Żubra — analiza właściwości strukturalnych i funkcjonalnych plemników przy użyciu cytometru przepływowego przed i po procesie kriokonserwacji <i>Niżański W., Partyka A., Bielas W., Prochowska S., Duszewska A.M., Bielecki W., Olech W.</i>	109
Zastosowanie metody Rapid-I do kriokonserwacji oocytów kłacz <i>Nowak A., Kochan J., Okólski A., Witkowski M., Witarski W., Młodawska W.</i>	110
Effect of spermatozoa hyperactivity after capacitation on <i>in vitro</i> fertilization effectiveness of boar semen — preliminary results <i>Poniedziałek-Kempny K., Rajska I., Gajda L., Gajda B.</i>	111
Effectiveness of collagenase type IA in domestic cat ovarian follicles enzymatic isolation protocol <i>Rodak O., Partyka A., Niżański W.</i>	112
Can epigenetic transformation of nuclear donor cells contribute to the preservation by inter-species (porcine→bovine or caprine→porcine) cloned embryos of their competences to develop extracorporeally to the blastocyst stage? <i>Samiec M., Skrzyszowska M., Opiela J.</i>	113
Perspective: The use of inner cell mass exchange for the study of placenta-mediated adult diseases <i>Sampino S., Loi P., Modliński J.A.</i>	114
The effects of oxytocin or PGF₂α added to boar semen on reproductive performance of sows artificially inseminated in summer <i>Schwarz T., Jaros P., Tuz R., Nowicki J., Małopolska M., Murawski M., Bartlewski P.M.</i>	115
Zastosowanie liofilizowanej frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia jako składnika rozcieńczalnika do konserwacji plemników najądrzowych psa <i>Strzeżek R., Dawid P., Kordan W.</i>	116
Wpływ wysokiej częstotliwości ejakulacji na jakość nasienia oraz wybrane biochemiczne wskaźniki plemników i plazmy nasienia psów <i>Strzeżek R., Orzeł I., Siemieńczuk J., Kordan W.</i>	117
Post-thaw viability of boar spermatozoa treated with fractionated seminal plasma prior to freezing <i>Wasilewska K., Zasiadczyk Ł., Fraser L.</i>	118
Laparoscopic method of oocytes' recovery in pig (L-OPU in pig) <i>Wieczorek J., Cegła M., Poniedziałek-Kempny K., Rajska I., Soból K.</i>	119
Blastomere biopsy as factor of risk for impaired fetal development in mouse model <i>Zacchini F., Arena R., Abramik A., Ptak G.E.</i>	120
Wpływ różnych wariantów rozcieńczalnika na przeżywalność kriokonserwowanych plemników knura <i>Zasiadczyk Ł., Kurpanik K., Fraser L., Filipowicz K., Kordan W.</i>	121
The influence of κ-opioid receptor agonist on transcriptomic changes in the anterior pituitary cells of gilts during mid-luteal phase of the estrous cycle <i>Czelejewska W., Żmijewska A., Dziekoński M., Okrasa S.</i>	122
Analiza składu moczu suk w różnych fazach cyklu jajnikowego, w kontekście poszukiwania aktywnych substancji semiochemicznych u psa domowego (<i>Canis familiaris</i>) <i>Dzięcioł M., Szumny A., Niżański W., Jezierski T., Woszczyło M., Pieczewska B.</i>	123
Cellular function of membrane estrogen receptor and its mechanism of action in bank vole testis <i>Hejmej A., Kamińska A., Pardyak L., Pawlicki P., Miłoś A., Bilińska B., Kotula-Balak M.</i>	124

Effect of central injection of donepezil on the bacterial endotoxin induced suppression of GnRH/LH secretion in ewes during the follicular phase of the estrous cycle	
<i>Herman A.P., Skipor J., Król K., Bochenek J., Krawczyńska A., Antushevich A., Kopycińska K., Romanowicz K., Tomaszewska-Zaremba D.</i>	125
Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on juxtacrine signaling in male gonad	
<i>Kamińska A., Pardyak L., Miłoś A., Pawlicki P., Kotula-Balak M., Bilińska B., Hejmej A.</i>	126
The participation of noradrenaline and β-adrenergic receptors in the secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ from the inflamed endometrium in gilts	
<i>Meller K.A., Calka J., Jana B.</i>	127
The influence of acetylcholine and its cotransmitters on the prostaglandin (PG)$F_{2\alpha}$ release by the inflamed porcine endometrium	
<i>Meller K.A., Calka J., Miciński B., Jana B.</i>	128
Evaluation of phosphorylation degree in seminal plasma proteins from preserved stallion semen identified by 2D-PAGE electrophoresis	
<i>Mietelska K., Orzolek A., Wysocki P., Kordan W.</i>	129
Central effect of allopregnanolone on adrenocorticotropin secretion in sheep; a pilot study	
<i>Misztal T., Hasiec M., Górski K., Marciniak E., Roszkowicz-Ostrowska K.</i>	130
Możliwości wystąpienia zjawiska melatoninooporności u owiec laktujących	
<i>Molik E., Nahajło K., Kordeczka K., Misztal T., Romanowicz K., Zięba D.</i>	131
Transport miedzi w procesie spermatogenezy	
<i>Ogórek M., Pierzchała O., Bednarz A., Grzmil P., Lendartowicz M.</i>	132
Localization and expression of connexin 43 in the testis, epididymis and ductus deferens of the turkey (<i>Meleagris gallopavo</i>) with yellow semen syndrome	
<i>Pardyak L., Kamińska A., Górowska-Wójtowicz E., Hejmej A., Słowińska M., Kotula-Balak M., Ciereszko A., Bilińska B.</i>	133
PPAR expression throughout the estrous cycle in the bovine endometrium	
<i>Socha B.M., Łupicka M., Szczepańska A.A., Korzekwa A.</i>	134
Effects of arachidonic acid metabolites on PPAR and RXR expression in bovine uterine cells	
<i>Szczepańska A.A., Łupicka M., Socha B.M., Korzekwa A.</i>	135
Characterization of stromal and perivascular mesenchymal stem or progenitor cells in porcine endometrium	
<i>Wiater J., Wartalski K., Karasiński J.</i>	136
The neuromodulatory action of obestatin on the NPY/AgRP and CART/α-MSH neurons in sheep	
<i>Wójcik-Gładysz A., Szlis M., Przybył B.J., Polkowska J.</i>	137
Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on the kisspeptin receptor expression in pituitary cells of gilts during the estrous cycle	
<i>Żmijewska A., Czelejewska W., Wrona K., Dziekoński M., Okrasa S.</i>	138
Ekspresja i lokalizacja błonowych receptorów progesteronu — PGRMC w ścianie macicy i łożysku krowy	
<i>Beyer N.M., Kowalik M.K., Kotwica J., Kowalewski M.P., Boos A.</i>	139
Effects of periconceptional maternal undernutrition and folic acid supplementation on emotional behavior and problem-solving skills in lambs	
<i>Florek W., Sampino S., Chincarini M., Sampino C., Modliński J.A., Loi P.</i>	140
The effect of prokineticin 1 on the porcine conceptus during implantation process	
<i>Goryszewska E., Kaczyński P., Baryła M., Waclawik A.</i>	141
Ekspresja elementów szlaku biosyntezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w błonie śluzowej macicy, zarodkach i trofoblastach świni	
<i>Guzewska M.M., Kaczmarek M.M.</i>	142
The influence of progesterone on orexin system protein expression in the porcine uterus during early gestation	
<i>Kamiński T., Dobrzyń K., Smolińska N., Kieżun M., Szeszko K., Kisiełewska K., Rytelewska E.</i>	143
The effect of progesterone on prepro-orexin, orexin receptor type 1 and orexin receptor type 2 gene expression in the porcine uterus during the implantation period	
<i>Kieżun M., Dobrzyń K., Smolińska N., Szeszko K., Rytelewska E., Kisiełewska K., Kamiński T.</i>	144

Effect of orexin B on StAR, CYP11A1 and HSD3B1 gene expression and progesterone and androstenedione secretion by the porcine uterus during the peri-implantation period	
<i>Kisielewska K., Rytelawska E., Kiezun M., Szeszko K., Dobrzyń K., Kamiński T., Smolińska N.</i>	145
Czy prolaktyna uczestniczy w procesie diapauzy embrionalnej u samic sarny europejskiej?	
<i>Korzekwa A., Zadroga A., Górzyska I., Bogdaszewski M., Steiner-Bogdaszewska Ż.</i>	146
Udział antagonistów receptora progesteronu w regulacji ekspresji mRNA i białka błonowych receptorów progesteronu w błonie śluzowej macicy krowy	
<i>Kowalik M.K., Rekawiecki R., Krajza K., Kotwica J.</i>	147
Wpływ wybranych czynników na ekspresję błonowych receptorów progestagenów mPRα i mPRβ w ludzkich komórkach choriocarcinomy łożyska JEG-3	
<i>Krajza K., Kowalik M.K., Kotwica J.</i>	148
The effect of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligands on the mRNA expression of Toll-like receptor (TLR-4) and anti-inflammatory cytokines (LIF and IL-10) in porcine endometrium on days 10–12 of pregnancy and the estrous cycle	
<i>Kunicka Z., Kurzyńska A., Kaczyńska B., Szydłowska A., Grzankowska M., Bogacka I.</i>	149
Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) participate in the synthesis of nuclear factor kappa-B (NF-κB) in porcine endometrium on days 10–12 of pregnancy and the estrous cycle	
<i>Kurzyńska A., Kunicka Z., Mierzejewski K., Siejwa P., Bogacka I.</i>	150
Wpływ chloroorganicznych insektycydów oraz ich metabolitów środowiskowych na syntezę i sekrecję P4, OT i PGF$_{2\alpha}$ ze skrawków kosmówki gładkiej ciężarnej krowy	
<i>Młynarczyk J., Wojciechowska A., Kotwica J.</i>	151
Actin and its binding proteins are involved in endometrial epithelial remodeling during early porcine pregnancy	
<i>Moza Jalali B., Likso P., Skarżyński D.J.</i>	152
Identyfikacja sposobów transportu miRNA w matczynej surowicy krwi podczas wczesnej ciąży u świni	
<i>Reliszko Ż.R., Gajewski Z., Kaczmarek M.M.</i>	153
The effect of orexin A on StAR, HSD3B1 and CYP11A1 gene expression and on progesterone and androstenedione secretion by porcine uterus during early pregnancy	
<i>Rytelawska E., Kisielewska K., Dobrzyń K., Kiezun M., Szeszko K., Kamiński T., Smolińska N.</i>	154
Effect of adiponectin on PGE$_2$ and PGF$_{2\alpha}$ release and COX2, CB1, mPGES-1 and PGFS gene expression in porcine endometrium during peri-implantation period	
<i>Smolińska N., Kiezun M., Szeszko K., Dobrzyń K., Rytelawska E., Kisielewska K., Kamiński T.</i>	155
Analiza porównawcza proteomu osocza suk ciężarnych i nie-ciężarnych	
<i>Szczubiał M., Wawrzykowski J., Dąbrowski R., Krawczyk M., Kankofer M.</i>	156
The influence of adiponectin on gene expression of StAR, GFPT1 and IRF1 in the porcine myometrium on days 15–16 of pregnancy	
<i>Szeszko K., Smolińska N., Dobrzyń K., Kiezun M., Rytelawska E., Kisielewska K., Kamiński T.</i>	157
Immunolocalization and mRNA expression of AQP1 and 5 in the pig uterine cells during luteal phase	
<i>Tański D., Młotkowska P., Skowrońska A., Skowroński M.T.</i>	158
The expression of pluripotency markers in the porcine myometrium	
<i>Waszkiewicz E., Zglej K., Martyniak M., Franczak A.</i>	159
Wpływ antagonisty receptorów leukotrienowych na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej macicy świń podczas fazy lutealnej cyklu rujowego i w okresie wczesnej ciąży	
<i>Wiśniewska A., Jaroszewski J.J., Markiewicz W.</i>	160
Wpływ czynników o aktywności endokrynnej (EAC) na rozwój endometrium i adenogenezę u neonatalnej świni	
<i>Czaja E., Knapczyk-Stwora K., Słomczyńska M.</i>	161
Reproductive behavior and fertility of ganders in relation to age and position in social hierarchic rank	
<i>Gumułka M., Rozenboim I.</i>	162
Ekspresja prepro-oreksyny i receptorów oreksyn w nadnerczach świni domowej (<i>Sus scrofa domestica</i>) w fazie lutealnej i pęcherzykowej cyklu rujowego	
<i>Kamińska B., Smolińska N., Bogacka I., Siawrys G., Kamiński T.</i>	163

The influence of the length of the catheter introduced into the cisterna magna and fourth ventricle of the sheep's brain on the cerebrospinal fluid collection	
<i>Kirsch K., Bocheńska A., Pietsch-Fulbiszewska A., Sowińska N., Kabała N., Borsuk A., Biernat W.</i>	164
Identification of pregnancy-associated glycoprotein-like gene family (PAG-L) in genome of Tarbagan marmot (<i>Marmota sibirica</i>)	
<i>Panasiewicz G., Sakowicz J., Bieniek-Kobuszevska M., Lipka A., Saveljev A.P., Gizejewski Z., Szafranska B.</i>	165
Expression profile of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) transcripts at selected stages of fetal development in lambs	
<i>Szczesna M., Kirsch K., Wawrzyn A., Zięba D.</i>	166
Wpływ transformującego czynnika wzrostu (TGF)-β1 na ekspresję i uwalnianie metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów z komórek nabłonkowych błony śluzowej macicy kłaczy	
<i>Szóstek-Mioduchowska A.Z., Pacewicz J., Baćławska A., Okuda K., Skarżynski D.J.</i>	167
Synteza prostacykliny i ekspresja jej receptorów w błonie mięśniowej macicy świni w cyklu rujowym i podczas wczesnej ciąży	
<i>Szymańska M., Łuba M., Blitek A.</i>	168
INDEKS AUTORÓW	169

WYKŁAD INAUGURACYJNY

NOTATKI

This image shows a full page of blank graph paper. The grid consists of small, equal-sized squares formed by thin gray lines. There are 20 columns and 20 rows of squares, creating a total of 400 square units. The grid covers the entire area of the page, leaving no margins or other markings.

The power of partnership: how to build the foundation for the future body?

Zernicka-Goetz M.

*Mammalian Embryo and Stem Cell Group, Department of Physiology, Development and Neuroscience,
University of Cambridge, Cambridge, UK*

mz205@cam.ac.uk

Mammalian embryogenesis requires intricate interactions between embryonic and extra-embryonic tissues to orchestrate and coordinate morphogenesis with changes in developmental potential. In both mouse and human embryos the first most dramatic series of morphogenetic transformations in embryo architecture and potency is initiated during embryo implantation into the body of the mother. Despite its major importance, an understanding of embryo remodeling during the implantation stage has been lacking, due to the embryo's inaccessibility within the mother. Motivated to understand this process, we have established a system permitting mouse and human embryogenesis beyond implantation *in vitro*. This allowed us to reveal steps of architectural remodelling and the importance of embryonic and extra-embryonic partnership in this process. Building upon this knowledge, we have attempted to mimic successive steps of this partnership with stem cells *in vitro*. To achieve this, we have combined mouse embryonic stem cells (ESCs) and extra-embryonic trophoblast stem cells (TSCs) in a 3D scaffold of extra-cellular matrix (ECM) that allowed us to generate structures whose morphogenesis is remarkably similar to natural embryos. By using genetically-modified stem cells and specific inhibitors, we show that embryogenesis of ESC- and TSC-derived embryos, ETS-embryos, depends on crosstalk involving Nodal signalling. When ETS-embryos develop further, they spontaneously initiate expression of mesoderm and primordial germ cell markers symmetrically on the embryonic — extra-embryonic border, in response to Wnt and BMP signalling. This study demonstrates that enabling crosstalk between embryonic and extra-embryonic stem cells in a 3D ECM scaffold is sufficient to trigger self-organization recapitulating spatio-temporal events and leading to faithful reconstruction of embryo architecture and patterning. This stem cell model of mammalian embryogenesis, in combination with genetic manipulations, might provide a powerful platform to dissect physical and molecular mechanisms that mediate natural embryogenesis.

WYKŁADY PLENARNE

Parent's choice — present trends in human reproduction

Wybór rodzicielstwa — współczesne trendy medycyny rozrodu

Ptak G.E.^{1,2}

¹*Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland;*

²*University of Teramo, Teramo, Italy;*

gptak@unite.it

Assisted Reproduction Technologies (ART) are developing rapidly to provide medical responses to pathologies compromising fertility and to the cultural shift to later childbearing. Thus, risks and benefits of various ART procedures, especially those recently established, needs to be thoughtfully tested. Available data about safety of ART are related to the normalcy at birth and in early childhood and less is known about long term effect. Surveys concerning physical and mental wellbeing in adulthood are not yet feasible due to relatively recent application of ART to human clinic. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has been introduced in clinical practice as a tool for selecting “healthy” embryos. PGD protocol include blastomere biopsy (BB), followed by genetic analysis to select embryos for transfer in utero. An exhaustive evaluation of BB safety is still missing. Few available epidemiological studies are controversial and/or are limited to normalcy at birth or early childhood. In mice, BB-offspring have an increased body weight, and our recent data (transcriptome analysis) revealed deregulation of genes involved in carbohydrates and lipid metabolism in the liver from BB-offspring, suggestive for their predisposition to metabolic disorders. Furthermore, our and other studies showed that mice born following BB had impaired memory and motor coordination, increased anxiety and altered responses to threatening or stress stimuli. Relevantly, not only ART procedures can be a risk factor for impaired neurodevelopment. We reported that mice conceived by aged parent (either fathers and mothers) exhibit behavioural abnormalities and changes in hippocampal gene expression. Advanced parental age might lead to an autism-like behaviour in mice. An increased frequency of neurological and neuropsychiatric diseases, including epilepsy, anxiety, autism dyslexia, psychotic conditions and other neurodevelopmental disorders have been observed in children having elderly mothers or fathers. Current trend toward later childbearing is strictly associated with the use of ART. Therefore, the evaluation of long term safety of each ART procedure should be seen as urgently needed response to contemporary trends in reproduction — trends in when (parental age) and how (naturally or through ART) conception occurs. A better understanding of prenatal mechanistic pathways will help to develop interventions aimed at the mother before and during gestation that may effectively prevent or reduce the negative health outcomes of offspring.

Supported by European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under grant agreement No 692185 (Acronym ERAofART) to GEP.

NOTATKI

This image shows a full page of blank graph paper. The grid consists of small, equal-sized squares formed by thin, light gray lines. There are 20 columns and 20 rows of these squares, creating a total of 400 square units. The background is white, and the grid covers the entire area of the page without any margins or additional markings.

The role of Y chromosome in directing spermatogenesis

Rola chromosomu Y w sterowaniu spermatogenezą

Ward M.A.

Institute for Biogenesis Research, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA;

mward@hawaii.edu

The mammalian Y chromosome encodes a battery of genes, many of which are thought to be involved in male reproduction. A substantial amount of work has been done to define which genes are important for maintaining sperm function under normal, *in vivo*, conditions. In the era of assisted reproduction technologies (ART), however, it is possible to bypass several steps of normal fertilization using immotile, nonviable, or even immature sperm. Consequently, in the context of ART, the essential roles of the Y chromosome genes may become abrogated. In recent years we have been investigating how many of the Y chromosome genes are required for successful ART and what functions these essential genes play. We have first shown that live offspring can be obtained from mice lacking the entire Y chromosome long arm, in which the Y chromosome was reduced from 89.5 Mb to ~3.5 Mb and encoded only 9 genes and 3 gene families. Next, we demonstrated that offspring can also be generated from males with the Y chromosome contribution limited to two genes, the testis determinant *Sry* and the spermatogonial proliferation factor *Eif2s3y*. These males produced only immature male gametes, haploid round spermatids, and not sperm. We therefore searched for and identified a third essential gene, *Zfy2*, which when added to *Sry* and *Eif2s3y* allowed for sperm formation and successful intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the absence of any other Y chromosome genes. Finally, we demonstrated that the function of *Sry* and *Eif2s3y* can be replaced by that of other genes, encoded on chromosomes other than Y, and that live offspring can be obtained from male mice without any Y chromosome DNA. We are currently applying what we have learned about the minimal essential Y chromosome genes to establish approaches allowing for rescue infertility of adult males. Our findings and ongoing work are relevant to discussions on Y chromosome gene function and evolution.

Supported by NIH HD072380 and HCF 14ADVC-64546 grants.

MINISYMPOZJUM II

NOTATKI

This image shows a full page of blank graph paper. The grid consists of small, equal-sized squares formed by thin gray lines. There are 20 columns and 20 rows of squares, creating a total of 400 square units. The grid covers the entire area of the page, leaving no margins or other markings.

Nowe geny i perspektywy diagnostyczno-prognostyczne w azoospermii — cz. I

Novel genes and diagnostic/prognostic trends in azoospermia — PART I

Kurpisz M.^{1,*}, Malcher A.¹, Yatsenko A.N.²

¹*Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań, Polska;*

²*Department of OBGYN and Reproductive Science, School of Medicine,
University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA;*

*kurpimac@man.poznan.pl

Azoospermia obejmuje tzw. bloki różnicowania spermatogenezy o często nieuleczalnym charakterze i występuje w ok. 10% niepłodności męskiej. Ta niewydolność gonad objawia się brakiem plemników w ejakulacji. Spermatogeneza może zatrzymać się na różnym poziomie różnicowania — pre-mejotycznym, mejotycznym czy też po-mejotycznym. Dla globalnej oceny genomowej praktykuje się różne narzędzia biologii systemowej jak aCGH (mikromacierze porównawczej hybrydyzacji genomowej), mikromacierze ekspresyjne oparte na bibliotekach ekspresyjnych jądra. Uzupełnieniem tych badań jest wytyczenie asocjacji danego typu niepłodności z polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP), jak również sekwencjonowanie potwierdzające wykrycie mutacji w obrębie wskazanego genu, odpowiedzialnego za niepłodność.

Posługując się biblioteką ekspresyjną gonady męskiej wykryliśmy spośród 5000 genów o statystycznie zmienionej ekspresji, 14 z największym zakresem odchylenia od tła. Spośród nich, 7 okazało się mieć znacząco obniżoną ekspresję — *UBQLN3* (ubiquilina), *FAM71F1* (rodzina z sekwencyjnie podobna do 71, członek 7), *CAPN11* (kalpaina), *SPATA3* (związany ze spermatogenezą 3), *GGN* (gametogenetyna) i *SPACA4* (związany z akrosomem nr 4). Spośród genów ulegających nadekspresji w blokach spermatogenezy zidentyfikowano *GTSF1L* (specyficzny czynnik gametocytów nr 1), *FSCN3* (homolog fascyny 3), *GSG1* (związany z komórkami germinalnymi nr 1), *TMEM225* (transbłonowy czynnik 225), *ADCY10* (cyklaza adenyłowa 10), *SPATS1* (związany ze spermatogenezą bogaty w serynę), *WBSCR28* (związany z syndromem Williama Beurena).

W badaniach systemowych związanych z niepłodnością rodzinną (bracia) zidentyfikowano kilka następnych genów, jak *TEX11* (specyficzny wyłącznie dla męskich komórek rozrodczych, odpowiedzialny za mejozę), *DDX53* (należący do grupy helikaz DEAD box) oraz *ACRC* (acidic repeat containing protein). Wymienione geny będą przedyskutowane w trakcie prezentacji.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (grant nr 2015/17/B/NZ2/01157).

Novel genes and diagnostic/prognostic trends in azoospermia — PART II

Nowe geny i perspektywy diagnostyczno-prognostyczne w azoospermii — cz. II

Yatsenko A.N.^{1,*}, Pollock N.², Huaiyang J.², Yatsenko S.A.², Rajkovic A.², Tomas J.², Sanfilippo J.¹,
Olszewska M.³, Kurpisz M.^{3,#}

¹*Departments of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, University of Pittsburgh, USA;*

²*Departments of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, and Urology, University of Pittsburgh, USA;*

³*Institute of Human Genetics Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland;*

*yatsenkoan@mwri.magee.edu; #kurpimac@man.poznan.pl

To carry out the study we have combined 2 powerful genomic techniques, high-resolution genomewide comparative genomic hybridization microarray and massive whole exome sequencing that capture all unique coding genes. We assemble 11 families and 289 sporadic cases diagnosed with non-obstructive azoospermia and male infertility. To rule out known causes of infertility we tested patients for chromosome aberrations and AZFs deletions. To identify invisible genomic aberrations we utilized genomewide 400K CGH array. To detect coding mutations we performed WES sequencing with SureSelectV6 capture library. We analyzed genomic data using public and commercial software tools; we applied classical Mendelian and complex models.

In first study, we found 7 (~15%) NOA patients with meiotic arrest having TEX11 genomic mutations. In the second study, we identified novel genomic mutations in nearly 25% of 78 NOA patients. The findings included 12 infertile males with X-linked hemizygous mutations and 9 patients with heterozygous mutations. These genes include *TEX11*, *SYCP2*, *SYCE1*, *KISS1R*, *CIRBP*, *PRSS55*, *PTCHD3*, *SERPINE2*, *TAF7L*, and *ACRC*. They followed inheritance in autosomal recessive and X-linked models. For efficient genomic analysis we built a testis-specific list with human, transgenic animal, functional, and meiotic and postmeiotic gene expression evidence. Interestingly, we found several instances of non-Mendelian inheritance of male infertility; we noticed combinations of multiple gene mutations in same infertile male and detected heterozygous aberrations in second gene in addition to found point mutation(s) in first gene. To confirm genetic cause of the top mutations, we initiated functional knock-out and knock-in studies in *Drosophila melanogaster* (fruit fly).

Supported by National Science Centre in Poland (2015/17/B/NZ2/011457).

Reciprocal chromosome translocations (RCTs) — the most frequent structural aberrations in infertile men

Translokacje chromosomowe wzajemne (TCW) w męskiej niepłodności

Olszewska M.^{1,*}, Wiland E.¹, Huleyuk N.², Yatsenko A.N.³, Chernykh V.B.⁴, Zastavna D.², Midro A.T.⁵, Kurpisz M.^{1,#}

¹*Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland;*

²*Academy of Medical Sciences, Dept. of Hereditary Pathology, Lviv, Ukraine;*

³*Dept. of OBGYN and Reproductive Science, University of Pittsburgh, PA, USA;*

⁴*Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation;*

⁵*University of Medical Sciences, Bialystok, Poland;*

*marta.olszewska@igcz.poznan.pl; #maciej.kurpisz@igcz.poznan.pl

Reciprocal chromosomal translocations (RCTs) are structural chromosomal rearrangements caused by an exchange of parts between chromosomes. Frequency of RCTs is being estimated as 1/700 in newborns, and thus RCTs are one of the most common structural aberrations in human genome. In infertile males, those frequencies rise 5–9-fold. Approx. 1% of infertile males are carriers of RCT. RCTs are present in ~0.7% of oligozoospermic males (with decreased sperm count), in which RCTs comprise ~16% of all detectable aberrations. In case of azoospermic males (with a lack of spermatozoa in ejaculate), 0.5% of them are RCT carriers. Genetically balanced RCTs usually do not affect phenotype of the carriers, but sperm parameters can be decreased in a half of the cases. Decreased sperm count may result from a disruption of meiotic progress caused by the conjugation of other chromosomes (not involved in RCT, mainly X and Y) to unpaired fragments of the RCT chromosomes during pachytene stage of meiosis. RCT carriers are at risk for abnormal pregnancy, miscarriages, and/or offspring with developmental disabilities. It is determined by the production of genetically unbalanced gametes originating from chromosomal segregation during the meiotic pachytene. What is interesting, in familial RCT cases (father and son, or two brothers) men with the same RCT have similar frequencies of different meiotic segregants but — what is still an unknown phenomenon — demonstrate different (in)fertility history. Results of meiotic segregation pattern in RCT carriers are known for >230 cases, so far. In approx. 50% of RCT carriers, an increased frequency of spermatozoa with aneuploidy of chromosomes that are not involved in rearrangement (interchromosomal effect — ICE) is present. Presence of aneuploid gametes arises from disrupted disjunction of chromosomes that are not involved in a translocation, and is one of the documented causes of reproductive failures.

Financial support: National Science Centre in Poland (grants no.: 2015/17/D/NZ5/03442, 2011/01/B/NZ2/04819, and NN401376339).

Identification and the role of sperm mRNA among molecular reasons of male infertility

Identyfikacja i rola plemnikowych mRNA w molekularnym tle przyczyn niepłodności

Depa-Martynów M.^{1,*}, Jędrzejczak P.²

¹COOK Medical, Polska;

²Katedra Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu;

*magdalena.depa.martynow@gmail.com

The discovery of mRNAs in mature male gametes show that sperm contribute more than just their DNA. Still little is known as to which of these transcripts may be used in the prognosis of male reproduction ability and which can have therapeutic and practical applications. Up to now, there was identified mRNAs holds for example: protamine 1 and protamine 2 (PRM1, PRM2), fertilin β and histone H1S1. The aim of the study was to determine the molecular basis of male infertility by indication of mRNA sperm transcripts and PRM1 and PRM2 proteins, which may influence on quality of sperm, fertilization ability and early development of zygotes and embryos in *in vitro* fertilization program.

A total of 92 infertile couples selected to IVF were investigated. Using reverse transcription and real-time quantitative PCR reaction method for transcripts levels and SDS-PAGE and western blotting analysis PRM1 and PRM2 proteins concentration were correlated with quality of sperm, fertilization ability of mature spermatozoa, and quality of zygotes and embryos obtained from *in vitro* fertilization program.

It is suggested that sperm protamines transcripts and proteins contribute not only in successful fertilization but may have an important impact in quality of sperm, and PRM1 transcript and their protein participate in early development of preimplantation embryos. Reduction in contents of fertilin β transcript in spermatozoa may be associated with lower sperm — oocytes zona binding. Sperm PRM1 and PRM2 aberrant ratio suggest male reproduction potential disorder. Increasing level of H1S1 sperm transcript correlates with increasing percentage of good quality of zygotes (Z1 and Z2) and embryos (A and B).

Proteomic identification of sperm antigens involved in immunological infertility

Identyfikacja antygenów plemnika związanych z niepłodnością na tle immunologicznym przy użyciu proteomiki

Nowicka-Bauer K.*, Kamieniczna M., Kurpisz M.

Institute of Human Genetics Polish Academy of Sciences, Poznan;

*knowicka@man.poznan.pl

It is estimated that immunological infertility may involve about 9–36% of couples. This pathological phenomenon is caused among others by the presence of antibodies that are able to recognize and bind to protein epitopes localized on the sperm surface. These antisperm antibodies (ASAs) can be produced by both males and females as well and their presence can lead to reduced or total infertility. Binding of ASAs to sperm entities can have an impact on spermatogenesis, sperm movement, inhibition of sperm capacitation and acrosomal reaction, disturbances of sperm-oocyte interaction and the early embryonic development. To understand the mechanisms responsible for immunological background of infertility researchers have focused on the identification of sperm antigens that are being recognized by ASAs. Moreover, the identification of sperm antigens seemed to be essential not only for diagnostic purposes but also for trials of preparation of an immunological contraceptive. However, the latest studies indicated that the presence of ASAs is not neutral during *in vitro* fertilization and the development of an embryo as some antisperm antibodies can be there transferred. For these reasons the knowledge of immunoreactive sperm antigens is inevitable.

In our study, the application of proteomic tools resulted in the identification of 80 human sperm antigens that could have been divided into three different groups: antigens specifically recognized by ASA(+) sera from infertile patients, antigens recognized by both ASA(+) and ASA(-) sera and antigens recognized only by ASA(-) controls. This segregation can shed some light on the immunity of human sperm. Moreover, among the antigens specific only for infertile patients, there were 12 sperm proteins known to be engaged in fertilization process and 3 proteins recognized only by infertile female sera. The knowledge of immunological reaction with sperm may contribute to better interpretation of fertility problem and be helpful in planning of procedures of assisted reproductive technology.

Supported by National Centre for Research and Development (NR 13006606) and National Science Centre (2011/01/B/NZ2/04836).

**WYKŁADY OTWIERAJĄCE
I PREZENTACJE USTNE W SESJACH**

WYKŁAD OTWIERAJĄCY

**High quality oocytes and embryos — the key to reproductive success
in domestic animals**

**Wysoka jakość oocytów i zarodków jako klucz do sukcesu w rozrodzie
zwierząt gospodarskich**

Boruszewska D.¹, Grycmacher K.¹, Cieslak D.^{2,*}, Kowalczyk-Zięba I.¹, Madeja Z.E.², Orszynowicz M.²,
Pawlak P.², Pers-Kamczyc E.³, Sinderewicz E.¹, Staszkievicz J.¹, Warzych E.², Wocławek-Potocka I.^{1,**,#}

¹*Zakład Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie;*

²*Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,*

³*Instytut Dendrologii PAN w Kórniku;*

*lechniak@up.poznan.pl , **i.woclawek-potocka@pan.olsztyn.pl

The developmental potential (quality) of oocytes and embryos is of pivotal importance for successful reproduction. A meta-analysis of the bovine ET data has shown that the pregnancy rate is directly influenced by the embryo quality and drops rapidly from 63% for the grade 1 to just 12% for the grade 4 embryos. Oocyte and embryo quality is a complex trait affected by a wide range of factors. There is also a panel of distinct parameters attributed to *in vivo* and *in vitro* produced embryos. Although the protocol for *in vitro* production of bovine embryos has been described as efficient (blastocyst yield of 30–40%), the quality of IVP embryos is still significantly reduced when compared to their *in vivo* counterparts. It is also evident that suboptimal *in vitro* conditions alter some cellular processes; thus, the embryo has to adapt to culture conditions. The quality results from a mixture of factors within the developmental environment: extrinsic (donor related traits *e.g.*, age, health, nutrition; follicular environment *e.g.* fatty acid composition of the follicular fluid) and intrinsic traits of the oocyte (*e.g.*, transcript and protein content, meiotic and cytoplasmic maturation — distribution of selected organelles like cortical granule, mitochondria and fat droplets, apoptosis) and the embryo (*e.g.*, morphology, cleavage kinetics, compaction, cavitation, apoptosis, transcript and protein content). Embryo quality has been of special importance to cattle breeders due to commercial implementation of the *ovum pick up* (OPU) method. The numbers of COCs and blastocysts per one OPU session are rather low in Holsteins and vary in a wide range (8.0–18.8 and 1.0–3.7, respectively). The lower quality and quantity of the OPU/IVP bovine embryos result from various obstacles connected with the method itself. However, scientists and practitioners have been working continuously to devise the most optimal stimulation protocols to overcome these obstacles and to acquire the best quality COCs.

[#]*alfabetyczna kolejność autorów*

Tracing mouse embryonic stem cells fate in environment of an early developing embryo with iPLEX MALDI-TOF mass spectrometry

Śledzenie losów mysich komórek zarodkowych w środowisku wczesnego zarodka przy użyciu spektrometrii masowej iPLEX MALDI-TOF

Bernat A.^{1,2,*}, Aksoy I.³, Bielawski K.P.¹, Savatier P.³

¹*Laboratory of Molecular Diagnostics, Laboratory of Genetic Analysis, Department of Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk & Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland;*

²*Laboratory of Experimental Embryology, Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland;*

³*INSERM U1208, Stem Cell and Brain Research Institute, Laboratory of Pluripotent stem cells in Mammals, Bron, France;*

*agnieszka.bernat@biotech.ug.edu.pl

Studying cellular fate/localization and behavior in early embryo is mainly based on expression of frequently toxic fluorescent dyes. Genetic labelling technologies shed some light on the dynamics of stem and progenitor cell fate determination during development, organogenesis and tumorigenesis; however, existing and applied methods used to identify the genetic labels are time-consuming, labor-intensive and require challenging analytical and computational steps for their identification. Here, we report the novel strategy based on mass spectrometry, with greatly reduced complexity of analysis, for detection of stem cells carrying DNA labels (barcodes) after their injections into early embryo.

iPLEX MALDI-TOF MS, conventionally used for high-throughput diagnostic genotyping, has been applied to detect designed DNA barcodes, introduced into mouse embryonic stem cells by means of viral infections. The use of mass spectrometry allows quick detection of DNA barcodes on the basis of a simple mass spectra analysis, — “there is or there is not” the barcode of a given mass.

All introduced DNA barcodes have been easily detected by iPLEX MALDI-TOF MS during routine cell culture of mouse embryonic stem cells, where they have been introduced *via* viral infection. We were able to detect single genetic labels in late blastocyst and in developing organs of fetuses, after introduction of barcodes and barcoded cells into 8-cell stage mouse embryo.

Advantages of presented method are various. Apart from short time-to-result and simple analysis, it is a versatile tool for studying population dynamics and controlled capture of single cell progeny thanks to the linkage of given barcode with targeted cell.

Supported by: Mobi4Health project (The European Union's 7th Framework Programme for research, technological development and demonstration, no. 316094) and PHC POLONIUM 2016/17 grant (no. 35209PC).

**The development of methodology to examine human semen plasma microvesicles
by flow cytometry**

**Metoda oceny mikropęcherzyków osocza nasienia ludzkiego za pomocą
cytometrii przepływowej**

Bochenek M.^{1,*}, Trzcińska M.¹, Gogol P.¹, Czerniecki J.², Ptak G.E.¹

¹*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki PIB, Balice;*

²*Zakład Biologii i Patologii Rozrodu Człowieka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn;*

*michal.bochenek@izoo.krakow.pl

Microvesicles represent a heterogeneous group of particles with size of up to 1000 nm that are released by a plasma membrane and express antigens specific for their parental cells. They are considered as vectors for intercellular biological information exchange — microparticles may transfer their components to the cells mediating its activation, phenotypic modification and reprogramming. The presence of such microparticles is a physiological phenomenon nevertheless a number of pathologies are associated with distinct increase of their number including inflammatory and autoimmune diseases. Microvesicles evaluation is promising also in sperm investigations as important component of male infertility diagnostics.

The aim of the study was to develop the reliable method of microvesicles examination and classification in human sperm. Semen samples from 10 patients were used. Semen plasma was prepared by centrifugation sperm samples at 10000 x g for 20 minutes. The benchtop flow cytometer (CytoFLEX, Beckmann-Coulter) equipped with blue laser was calibrated using standardized beads 50, 100, 200, 300 and 500 nm. The laser light scatter parameters — as vesicles' "morphology" were collected. To label the membrane-originated and prostatesome objects, the AnnexinV/FITC and CD13/APC-Cy7 were used, respectively. Absolute number/μl and percentage of positive objects were calculated.

Wide range of AnnexinV /CD13 positive microvesicles ($0.17 \times 10^3 / \mu\text{l}$ — $35.16 \times 10^3 / \mu\text{l}$) was found in the sperm samples; the percentage ranged 1.1%–27.7% of all measured objects. The size of positive microvesicles was near 500 nm. Examination of objects smaller than 200–300 nm was not possible with the use of the standard blue (488 nm) laser.

Flow cytometry appeared to be a fast and reliable method for investigation of microvesicles larger than 200 nm. Selective markers as AnnexinV and CD13 allow to confirm the origin of the investigated microvesicles. The wider panel of monoclonal antibodies is highly recommended for using in the future.

Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) synthesis and action in preimplantation bovine embryos obtained from oocytes of good and poor quality

Synteza i działanie prostaglandyny F_{2α} w przedimplatacyjnych zarodkach bydłęcych uzyskanych z dobrej i złej jakości oocytów

Grycmacher K.*, Boruszewska D., Sinderewicz E., Kowalczyk-Zięba I., Staszkievicz J., Wocławek-Potocka I.

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*k.grycmacher@pan.olsztyn.pl

PGF_{2α} belongs to active lipids involved in physiology of female reproduction. It was showed that the time of first oocyte cleavage reflects developmental competence of *in vitro* produced embryos. The aim of our study was to determinate possibility of PGF_{2α} synthesis and action in preimplantation bovine embryos and the relation between quality of oocytes and mRNA and protein expression of PGF_{2α} synthase (PGFS) and receptor (PGFR).

The mRNA expression of *PGFS* and *PGFR* was determined by real-time PCR in *in vitro* produced 2-, 4-, 8-, 16-cell embryos, morulas and blastocysts derived from oocytes of good and reduced quality (early and late cleaved embryos; 6 replicates in each group). The good quality embryos cleave early — till 30 h post-fertilization, whereas embryos with reduced quality cleave 6 h later. The protein immunolocalization in 2–16-cell embryos was determined by immunofluorescence. Obtained data were analyzed using two-way ANOVA test (GraphPad PRISM).

PGFS mRNA expression in 16-cell embryos was lower than in 8-cell embryos in the early cleaved group. *PGFS* and *PGFR* mRNA expression in the late cleaved group was higher than in early cleaved group at the stage of 2 and 16 cells, and similarly at stage of 4 cells for *PGFS*. In the group of the late cleaved, grade A blastocysts we found higher *PGFS* expression than in the early cleaved group. Similarly, we showed higher *PGFS* expression in developed grade C blastocysts from late than early cleaved embryos. Within the early cleaved group of expanded blastocyst *PGFS* expression increased from grade A to the grade C blastocysts. In the hatched, late blastocysts we observed higher *PGFS* transcript abundance than in the early cleaved group. At morula stage, *PGFR* mRNA expression was significantly higher in grade C than A and B embryos within the late cleaved group. In the grade C morulas *PGFR* expression was higher in late than early cleaved group. We found that in early blastocysts *PGFR* mRNA expression increased from grade A to grade C but only in the late cleaved embryos. We showed higher *PGFR* expression in grade C early and developed blastocysts from late than early cleaved embryos. The immunostaining confirmed the presence of PGFR and PGFS proteins in all examined embryos.

In the bovine preimplantation embryos *PGFS* and *PGFR* transcripts exert a dynamic expression. PGF_{2α} can play an important role during preimplantation embryo development.

Supported by Polish National Science Centre: 2015/17/B/NZ9/011688.

WYKŁAD OTWIERAJĄCY

How omics tools can advance research in reproductive biology?
Jak narzędzia 'omiki' wpływają na postęp badań w biologii rozrodu?

Dietrich M.A.^{*}, Kaczmarek M.M.[#]

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

^{*}m.dietrich@pan.olsztyn.pl; [#]m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl

Omics technologies, such as transcriptomics and proteomics, offer a huge amount of information regarding the biological processes, giving an excellent tools to broaden our knowledge of complex interactions governing reproductive success.

Transcriptomic analysis identified hundreds of small non-coding RNAs in maternal circulation, female reproductive tract, embryos and uterine extracellular vesicles, precisely defining reproductive status of the livestock, such as pigs. Both canonical and non-canonical microRNAs were shown as functional regulators of putative target genes, such as leukemia inhibitor factor, essential for embryo implantation in several mammalian species. Further, combined large-scale proteomic approach — SILAC and target prediction analysis identified direct and indirect effects of miRNAs on the porcine luminal epithelium function, being the first site of embryonic signal recognition during pregnancy.

Proteomics analysis identifies hundreds or thousands proteins of male and female reproductive tissue and cell involved in a various dynamic processes such as spermatogenesis, oogenesis, sperm maturation and motility. Recently, we introduced shotgun proteomics to generate catalogue of rainbow trout and carp semen proteins allowing better understanding of their function especially in sperm protection against oxidative stress and microbial attack as well as sperm metabolism and energy supply. Beside descriptive proteomics we applied 2D-DIGE approach for comprehensive characterization of the mechanism of the blood-testis barriers and sperm motility as well as cryogenic damage to sperm proteins.

Although advancing our knowledge omics technologies are facing one major challenge to manage the data flood and to perform data analysis and integration in an optimal manner, leading to discoveries of novel, unexplored mechanisms assuring reproductive success.

Supported by the National Science Centre, Poland (2016/21/B/NZ9/03620, 2014/15/B/NZ9/04932, 2011/01/N/NZ2/04824).

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin affects the expression of genes involved in TGF- β /BMP signaling pathway in porcine granulosa cells

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyna wpływa na ekspresję genów szlaku TGF- β /BMP w komórkach ziarnistych świni

Nynca A.^{1,*}, Sadowska A.², Paukiszto L.³, Orlowska K.², Ruszkowska M.², Swigonska S.¹, Molcan T.², Ciereszko R.E.^{1,2}

¹*Laboratory of Molecular Diagnostics,*

²*Department of Animal Physiology,*

³*Department of Plant Physiology, Genetics and Biotechnology,*

Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;

*anna.nynca@uwm.edu.pl

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), a ubiquitous environmental pollutant, elicits a variety of toxic effects including those exerted in human and animal reproductive systems. It was found that TCDD affects progesterone and estradiol production by granulosa cells in pigs. Disruption of granulosa steroidogenesis may lead not only to follicular dysfunction and atresia but may affect the entire reproductive tract of the female. The aim of the current study was to examine, by means of next generation sequencing (NGS), expression of genes involved in the mechanism of TCDD action in granulosa cells of pigs.

Porcine granulosa cells (AVG-16 cell line) were cultured in six-well plates (1×10^6 cells/ 3 ml medium: DMEM with 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 0.1 mM non-essential amino acid, 2.5 ng/ml fibroblast growth factor-basic human and antibiotics mixture [100 U penicillin, 100 μ g streptomycin and 0.25 μ g amphotericin B/ml]). After reaching 60–65% confluency, the cells were treated with TCDD (100 nM) for 3, 12 or 24 h. Next, total RNA was isolated from cells and designated for NGS.

Bioinformatic analysis (limma, edgeR and DESeq statistical packages) of the gene expression within the transforming growth factor β (TGF- β)/ bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway — one of the signal transduction pathways relevant for ovarian functions — revealed significant changes ($P < 0.05$ and fold change ≥ 2.0) in the expression of 17 (6 up- and 11 down-regulated), 4 (1 up- and 3 down-regulated) and 7 (4 up- and 3 down-regulated) genes after 3, 12 and 24 h of TCDD treatment, respectively. TCDD down-regulated expression of genes such as follistatin, Smad family member 2 (*SMAD2*) and 9 (*SMAD9*), activin receptor II (*activinRII*), *BMP4* and DNA-binding protein inhibitor, whereas up-regulated the expression of *activin*, *SMAD6* and *BMP receptor I* genes.

These results suggest that TCDD may affect granulosa cell proliferation and follicular development *via* disturbing the TGF- β /BMP signaling pathway.

This study was supported by grants from the National Science Center (2012/05/B/NZ9/03333) and UWM (528.0206.0806).

Identification and characterization of long non-coding RNAs in porcine granulosa cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

Identyfikacja i charakterystyka długich niekodujących RNA w komórkach ziarnistych świni poddanych działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny

Ruszkowska M.^{1,*}, Paukszt L.², Nynca A.³, Sadowska A.¹, Orlowska K.¹, Swigonska S.³, Molcan T.¹, Jastrzebski J.P.², Ciereszko R.E.^{1,3}

¹*Department of Animal Physiology,*

²*Department of Plant Physiology, Genetics and Biotechnology,*

³*Laboratory of Molecular Diagnostics,*

Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;

*monika.ruszkowska@uwm.edu.pl

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are novel class of no protein-coding transcripts with a length exceeding 200 nucleotides. These RNA molecules are transcribed by RNA polymerase II from intronic or intergenic regions of the genome and undergo post-transcriptional modification. LncRNAs are thought to have an important role in the regulation of gene expression as well as in protein translation and stability. To date, thousands of lncRNAs were identified in mice, rats and humans, nevertheless porcine lncRNAs are still poorly characterized. The aim of the study was to identify and characterize lncRNAs in porcine granulosa cell line — AVG-16, and to determine the effects of the most toxic dioxin, *i.e.*, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the lncRNA expression profile.

The AVG-16 cells were treated with TCDD (100 nM) for 3, 12 or 24 h (n=2 biological replicates per one time point). At the end of the culture, total RNA was isolated and designated for next generation sequencing (NGS). To identify putative novel lncRNAs and to verify the reliability of the obtained results, a customized multi-step bioinformatic pipeline was employed.

As a result, 777 novel lncRNAs from 766 loci were identified in AVG-16 cells. In comparison to protein-coding genes, porcine lncRNAs were characterized by low exon number, short length and low expression level, which is in agreement with lncRNAs of other mammalian species. It was revealed that the expression of 17 (11 up- and 6 down-regulated), 4 (2 up- and 2 down-regulated) and 3 (2 up- and 1 down-regulated) lncRNAs were significantly changed ($\log_2(\text{fold change}) > 1$ and $p\text{-adjust} < 0.005$) after 3, 12 and 24 hours of TCDD treatment, respectively.

To our knowledge, this is the first study describing lncRNAs of porcine granulosa cells. These results will expand our knowledge concerning lncRNAs features as well as will provide a spur to further exploration of their role in granulosa cells including TCDD-caused toxicity.

This study was supported by grants from National Science Center (2012/05/B/NZ9/03333) and UWM (528.0206.0806).

Seasonal changes in bull semen proteome
Zmiany sezonowe w proteomie nasienia buhaja

Westfalewicz B.*, Dietrich M.A., Mostek A., Słowińska M., Judycka S., Ciereszko A.

*Department of Gamete and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research,
Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

*b.westfalewicz@pan.olsztyn.pl

The season is one of the important factors influencing variation in semen quality in mammals, including bulls; however, the exact mechanisms underlying those changes are not entirely known. The aim of this study was to evaluate whether the season can influence the proteome of bull semen.

The quality of semen collected during spring, summer, autumn and winter (n = 6 in each group) was assessed by establishing sperm motility parameters using computer-assisted sperm analysis system, and by measuring sperm viability and the level of membrane oxidation using flow cytometry. 2D-DIGE analysis coupled with MALDI-TOF mass spectrometry was used to detect the seasonal changes in seminal plasma proteome. The image analysis of protein spots were performed using DeCyder software. Statistical analyses were conducted using one-way ANOVA.

Our results have shown significant seasonal change in sperm motility, which was the highest in autumn and winter, and the lowest in spring and summer. There was significant effect of season on sperm viability, with the highest percentage of dead sperm recorded in summer. There was no effect of season on sperm oxidation. The proteomic analysis allowed for identification of protein spots changing significantly during the year. The largest amounts of spots (19), changed significantly in abundance between winter and summer. Abundance of 15 spots, representing 4 proteins (epididymal-specific lipocalin-5; C-C motif chemokine 2 precursor; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B; seminal ribonuclease), increased from winter to summer, while abundance of the remaining 4 proteins (acidic seminal fluid protein, albumin, clusterin, platelet-activating factor acetylhydrolase precursor), decreased.

In summary, our results suggest that changes in seminal plasma proteome may affect sperm motility and viability. The possible impact of those protein changes on semen quality should be elucidated in further studies, in order to better understand the mechanisms lying behind seasonality of cattle breeding.

This work was supported by the National Science Center (2013/09/N/NZ9/01655 and 2013/09/B/NZ9/01752) and the Institute of Animal Reproduction and Food Research of PAS.

WYKŁAD OTWIERAJĄCY

Rola chemokin i komórek immunologicznych w funkcji ciała żółtego

Role of chemokines and immune cells in the corpus luteum function

Andronowska A.^{*}, Witek K.J., Zięcik A.J.

Zakład Mechanizmów Działania Hormonów, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn;

^{*}a.andronowska@pan.olsztyn.pl

Główną funkcją ciała żółtego jest produkcja progesteronu (P4) niezbędnego do prawidłowego przebiegu ciąży. Przy braku zapłodnienia, ciało żółte ulega funkcjonalnej i strukturalnej luteolizie, podczas której obserwuje się zwiększony napływ komórek immunologicznych. Badania ostatnich lat wskazują, iż chemokiny, produkowane przez komórki immunologiczne, mogą być pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane w regulację funkcji ciała żółtego. W badaniach tych podjęto próbę wyjaśnienia udziału układu immunologicznego na niektóre aspekty funkcji ciała żółtego świni.

Ciała żółte pobrane od loszek w 10., 12. i 14. dniu cyklu/ciąży posłużyły do określenia profilu ekspresji chemokin i ich receptorów metodą qPCR i Western blot. Izolowane z krwi obwodowej aktywowane i kontrolne PBMCs (ang. *peripheral blood mononuclear cell*; limfocyty, monocyty) oraz PMNs (ang. *polymorphonuclear leukocytes*; granulocyty) wykorzystano do określenia wpływu $\text{PGF}_{2\alpha}$ i chemokin na ich migrację i proliferację. Izolowane komórki ciała żółtego z 12. dnia cyklu posłużyły do określenia wpływu chemokin, $\text{PGF}_{2\alpha}$, PMNs i PBMCs na syntezę P4 w komórkach lutealnych oraz proliferację i migrację komórek śródbłonkowych. Dane analizowano jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz testem Tukey'a lub Dunneta.

Wykazano istotny wzrost ekspresji CXCL10, CXCL9 i CCL8 w 12. dniu oraz CXCL12, CXCL8, CCL2, CCL4 i CCL5 w 14. dniu cyklu rujowego na poziomie genu i białka. Zarówno aktywowane PMNs, jak i PBMCs hamowały produkcję P4. Istotny spadek syntezy P4 *in vitro*, obserwowano również pod wpływem $\text{PGF}_{2\alpha}$ oraz CCL2, CXCL2, CCL4 i CCL8. Najsilniejszym chemoatraktantem PMNs okazała się CXCL8, natomiast PBMCs migrowały pod wpływem większości chemokin. PMNs oraz CCL8 i CXCL12 istotnie stymulowały proliferację komórek śródbłonka, natomiast CCL4, CXCL9 i CXCL12 wpływały na tworzenie struktur kapilaro-podobnych.

Podsumowując, komórki immunologiczne poprzez chemokiny mogą wpływać na komórki ciała żółtego obniżając syntezę progesteronu i modulując lutealną angiogenezę.

Badania finansowane ze środków NCN DEC-2012/05/B/NZ9/03330.

The expression of the immune system genes is affected by the presence of the embryos in the porcine oviductal isthmus

Obecność zarodków w cieśni jajowodu świni wpływa na ekspresję genów układu immunologicznego

Martyniak M.*, Franczak A., Kotwica G.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*marcin.martyniak@uwm.edu.pl

In pigs, the embryos are present in the isthmus of the oviduct until days 2–3 of gestation. Their contacts with the epithelial cells of the oviduct may alter gene expression in these cells, which results in variety adaptations of this organ. Thus, the aim of this study was to determine if the presence of embryos in the isthmus alters expression of the genes involved in immunological processes.

Microarray analysis (porcine 4×44K microarrays) was carried on the isthmus of the oviducts isolated from pigs on days 2 or 3 of the estrous cycle (n=4) or gestation (n=4). Microarrays were analyzed using GeneSpring software, Database for The Annotation Visualization and Integrated Discovery Bioinformatics Resources 6.8 and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Transcriptomic analysis revealed eight differentially expressed genes: interleukin 6 (*IL6*); inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma (*IKBKG*); mitogen-activated protein kinase 8 (*MAPK8*); myeloid differentiation primary response 88 (*MYD88*); mitogen-activated protein kinase kinase 1 (*MAP2K1*); toll like receptor adaptor molecule 2 (*TICAM2*); phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5 (*PIK3R5*), and nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells, inhibitor alpha (*NFKBIA*); ($P \leq 0.05$, fold change ≥ 1.2). All of these genes are involved in the toll-like receptor signaling pathway and five out of eight genes (*IL6*, *IKBKG*, *MAPK8*, *RIPK2*, and *NFKBIA*) are engaged in the NOD-like receptor signaling pathway.

In conclusion, the presence of embryos in the isthmus affects the gene expression in this compartment of the oviduct, including genes involved in the functioning of the immune system. The regulation of the genes expression in the oviduct may help to protect the newly-formed embryos and support their further development.

Supported by UWM Olsztyn, grant No. 12.620.014–300.

Folliculogenesis in the neonatal pig ovaries affected by endocrine active compounds (EACs)

Folikulogeneza w jajniku neonatalnej świni zaburzona działaniem czynników o aktywności endokrynnej

Ślomiczyska M.^{1,*}, Knapczyk-Stwora K.¹, Grzesiak M.², Czaja E.¹, Witek P.¹, Koziorowski M.³, Nynca A.⁴, Ciereszko R.E.⁴, Jastrzebski J.P.⁵

¹*Department of Endocrinology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Krakow;*

²*Department of Animal Physiology and Endocrinology, University of Agriculture, Krakow;*

³*Department of Physiology and Reproduction of Animals, University of Rzeszow, Rzeszow;*

⁴*Laboratory of Molecular Diagnostics, Faculty of Biology and Biotechnology,*

University of Warmia and Mazury in Olsztyn;

⁵*Department of Plant Physiology, Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*maria.slomiczyska@uj.edu.pl

Postnatal ovarian development become a field of increasing investigation over recent years. Our research hypothesis was that during neonatal follicles formation and transition to the primary stage, the balance between androgens and estrogens is indispensable.

The neonatal pigs were injected with testosterone propionate (TP), flutamide (Flu), 4-tert-octylphenol (OP), ICI 182,780 (ICI) and methoxychlor (MXC) between days 1 to 10 post partum (n=4 per each group). Control animals were treated with corn oil with DMSO. The ovaries were collected from 11-day-old pigs. By employing next-generation sequencing differentially expressed genes (DEGs) were identified. Histological examinations were conducted by hematoxylin & eosin staining and the number of follicles at each developmental stage were evaluated. Cell proliferation was performed by analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive cells (immunohistochemistry). Cell apoptosis was done by identification of apoptotic cells. The differences between control and investigated compounds-treated groups were assessed using Mann-Whitney U test and were considered statistically significant at the 95% confidence level ($P < 0.05$).

RNAseq analysis revealed DEGs associated with several pathways including cell adhesion and Wnt signaling. Histological analysis revealed that in OP and TP groups the process of folliculogenesis was accelerated while in Flu, ICI and MXC groups was delayed. Analysis of proliferation index showed the increased number of follicles with PCNA-positive oocytes in OP group, and the decreased number in Flu and MXC groups. Results from apoptosis revealed no apoptotic cells in control and MXC groups, while in TP, Flu, OP and ICI groups the staining was present only in the individual cells.

Compounds with hormonal activity revealed specific effects on folliculogenesis in neonatal porcine ovaries, characterized by changes in proliferation, apoptosis and many molecular pathways during follicular recruitment.

Supported by National Science Centre in Poland (Grant No. 2015/17/B/NZ9/01457).

miRNA-mRNA interactions in the porcine corpus luteum during early pregnancy

Interakcje miRNA-mRNA w ciałku żółtym świni podczas wczesnej ciąży

Przygodzka E.* , Myszczyński K., Sokołowska G., Kaczmarek M.M.

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*e.bolzan@pan.olsztyn.pl

Recently, we identified several microRNA (miRNA) showing different expression profiles in the porcine corpus luteum (CL) of pregnant *vs.* cyclic animals. Interestingly, some upregulated miRNAs occurred in independent clusters. miRNAs belonging to *ssc-miR-99b* cluster shared common targets, such as *NR4A1* — known transcription regulator of steroidogenic enzymes. These observations led us to hypothesis that selected miRNAs-mRNA interactions can support luteal function maintenance during early pregnancy in the pig.

To verify this hypothesis, CL were collected from pigs on day 14 of the estrous cycle and pregnancy (n=5–7/reproductive status). CL of both cyclic and pregnant gilts were used to assess expression of *NR4A1*. CL of pregnant gilts were cut into slices and incubated in the presence of control (medium) or prostaglandin (PG) E_2 and/or estradiol (E_2) for 6, 12 and 24 hours to verify *ssc-miR-99b* cluster and *NR4A1* levels. Bioinformatics analysis, using Phyton script, was performed to find transcription binding sites in *ssc-miR-99b* promotor. The expression of miRNAs and *NR4A1* was examined using real-time PCR, while obtained results were analyzed with one-way ANOVA or t-test.

The expression of *NR4A1* was lower in CL of cyclic gilts compared to pregnant counterparts. The expression of miRNAs belonging to *ssc-miR-99b* cluster increased ($P<0.05$) in luteal slices treated with and/or E_2 after 12 hours of incubation. Simultaneously, level of *NR4A1* was downregulated ($P<0.05$) in slices incubated with E_2 . *In silico* analysis revealed that transcription of *ssc-miR-99b* can be regulated by SP1, a transcription factor commonly co-operating with E_2 in regulation of reproductive processes.

It seems likely that conceptus signals, mainly E_2 , can support luteal function acting *via* non-classical ER/SP1 pathway to enhance the expression of selected miRNAs targeting luteolytic genes.

Supported by the statutory funds of IARFR, PAS in Olsztyn and KNOW Consortium “Healthy Animal — Safe Food”.

WYKŁAD OTWIERAJĄCY

Możliwości zastosowania technik wspomaganego rozrodu w ratowaniu populacji ssaków i ryb zagrożonych wyginięciem
The use of Assisted Reproductive Techniques in programs of rescue of endangered mammals and fish

Niżański W.^{1,*}, Ciereszko A.^{2,#}

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

²Institut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauki w Olsztynie;

*wojciech.nizanski@upwr.edu.pl; #a.ciereszko@pan.olsztyn.pl

Ponad 3000 gatunków zwierząt znajduje się na liście zwierząt zagrożonych wyginięciem, w tym wiele psowatych oraz wszystkie 38 gatunków dzikich kotowatych. Od 80-tych lat XX stulecia prowadzone są badania nad możliwościami wykorzystania technik wspomaganego rozrodu (ART) u ginących ssaków. U kotowatych, procedury ART zostały dokładnie opracowane w oparciu o model kota domowego, głównie ze względu na dostępność materiału biologicznego pozyskiwanego przy gonadektomii samców i samic. Opracowano metodykę bankowania nasienia i oocytów po pozyskaniu gamet przyżyciowo i pośmiertnie, zarówno *in situ*, jak i *ex situ*. Zastosowano metody otwarte i zamknięte witryfikacji i programowanego zamrażania. Z metod pobierania nasienia zastosowano z powodzeniem metodę stymulacji farmakologicznej ejakulacji, sztuczną pochwę, nacinanie najądrzy oraz elektroejakulację. Pozyskiwanie oocytów przeprowadzane jest poprzez nacinanie kory jajnika lub poprzez laparoskopową aspirację. Zarodki uzyskiwane są z powodzeniem zarówno techniką klasycznego IVF, jak i ICSI. Ta druga metoda cechuje się zdecydowanie wyższą wydajnością. Opracowano wydajne metody kriokonserwacji zarodków uzyskanych metodą *in vitro* oraz embriotransferu. Z wykorzystaniem ART uzyskano jak dotychczas mioty u 10 gatunków dzikich kotowatych. U psowatych, ART ciągle nie przynoszą zadowalających wyników ze względu na trudności w zakresie optymalizacji warunków dojrzewania *in vitro* oocytów. Jak dotychczas przeprowadzono u psa domowego jedyną udaną próbę IVF z urodzeniem miotu.

W ostatnich latach dokonano znaczącego przełomu w kriokonserwacji nasienia ryb łososiowatych, polegającego na uzyskaniu istotnej poprawy jakości kriokonserwowanego nasienia, optymalizacji metodyki zamrażania i rozmrażania, uzyskania postępu w przeskalowaniu metody umożliwiającej wdrożenie do warunków praktycznych. Uzyskane wyniki opublikowano w wiodących czasopismach światowych zajmujących się badaniami aplikacyjnymi, w szczególności *Aquaculture*. Opracowana metodyka stała się podstawą rozpoczętej procedury patentowej w Polsce i za granicą. Uzyskanie projektu TANGO ukierunkowanego na wdrożenie kriokonserwacji do praktyki największej polskiej wylęgarni ryb łososiowatych Dąbie daje szansę na wdrożenie kriokonserwacji nasienia do hodowli ryb.

Przedstawione wyniki badań finansowano ze środków: NCBR PBS3/B8/16/2015 oraz CRYOHATCH TANGO1/266953/NCBR/2015.

Uzyskanie wczesnej blastocysty żubra w warunkach *in vitro*

Obtaining of wisent early blastocyst *in vitro*

Duszeńska A.M.^{1,*}, Gręda P.¹, Baraniewicz M.¹, Bielecki W.², Niżański W.³, Partyka A.³, Tracz M.⁴,
Nowak Z.⁵, Chelmońska-Soyta A.⁶, Olech W.⁵

¹Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

²Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

³Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

⁴Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

⁵Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

⁶Katedra Immunologii, Fizjopatologii i Prewencji Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

*duszeńskaanna@hotmail.com

Żubr (*Bison bonasus*) jest gatunkiem zagrożonym (kategoria VU wg. IUCN) i chronionym międzynarodowym prawem. Najpoważniejszym zagrożeniem dla tego gatunku jest ograniczona pula genowa oraz niewielka liczebność populacji. W Europie istnieje ponad 300 stad odizolowanych od siebie, co ogranicza możliwości zachowania zmienności genetycznej w obrębie tego gatunku. Poważnym zagrożeniem dla żubra są choroby, które mogą eliminować pojedyncze osobniki, a nawet całe stada. Jednym z kierunków zachowania tego gatunku jest wykorzystanie biotechniki z zakresu biotechnologii rozrodu. Celem prezentowanych badań było uzyskanie zarodków żubra *in vitro*

Od dorosłej samicy żubra ze stada w Puszczy Boreckiej, eliminowanej poza sezonem rozrodczym, pobrano jajniki. Z pęcherzyków jajnikowych izolowano kompleksy wzgórek jajonośny-oocyt (COCs), które już podczas 6-godzinnego transportu do laboratorium dojrzewały *in vitro* w temperaturze 38,5 °C. W laboratorium, COCs kontynuowały dojrzewanie przez kolejne 24 godziny w temperaturze 38,5 °C i 5% CO₂ w powietrzu. Dojrzałe COCs zapładniano *in vitro* plemnikami żubra po ich rozmrożeniu. Plemniki pochodziły z najądrzy pobranych *post mortem* od samca eliminowanego rok wcześniej. Uzyskane zygoty hodowano *in vitro* przez 192 godzin w temperaturze 38,5 °C i 5% CO₂ w powietrzu. Przeprowadzono ocenę rozwoju zarodków po 48, 96 i 192 godzinach hodowli.

Z 12 izolowanych od żubrzcyc COCs, do dojrzewania *in vitro* zakwalifikowano 8 COCs. Dojrzałość do zapłodnienia osiągnęło 6 COCs (75%). Po 48 godzinach, stadium 2 blastomerów uzyskało 6 zarodków (100%). Po 96 godzinach, stadium powyżej 8 blastomerów osiągnęły 2 zarodki (33,33%). Po 192 godzinach uzyskano jedną wczesną blastocystę (16,66%), którą następnie poddano witrifikacji.

Po wieloletnich próbach, po raz pierwszy na świecie uzyskano zarodek żubra w warunkach *in vitro*, co otwiera nowe perspektywy dla zachowania tego gatunku poprzez tworzenie banku zarodków oraz gamet.

Praca finansowana ze środków Funduszu Leśnego.

Characteristics of cauda epididymal spermatozoa of red deer (*Cervus Elaphus* L.) during the rutting season — analysis of sperm kinematic motility parameters and activity of selected antioxidant enzymes

Charakterystyka plemników ogona najądrzy jelenia szlachetnego (*Cervus Elaphus* L.) podczas rykowiska właściwego — analiza kinematycznych parametrów ruchu oraz aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych

Koziorowska-Gilun M.*, Dziekońska A., Wasilewska K., Kordan W.

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;*

*magda.koziorowska@uwm.edu.pl

The aim of the study was to evaluate the motility parameters of cauda epididymal spermatozoa and the activity of three antioxidant enzymes in red deer cauda epididymal semen for future use in preservation technology.

In the study, spermatozoa and fluids originating from the cauda epididymis were used. The epididymes were collected *post mortem* from ten bucks hunted during the rut, within the hunting economy programme in the Nowe Ramuki Forest District. The CASA system was used to analyze sperm motility including total motile spermatozoa (TMOT), progressive motile spermatozoa (PMOT) and sperm kinematic parameters of movement such as: velocity average path (VAP), velocity straight line (VSL), curvilinear velocity (VCL), mean amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR) and linearity (LIN). Additionally, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were evaluated in cauda epididymal spermatozoa and fluids. Data were analyzed by using the STATISTICA software package. The Student's t-test was used to compare the enzyme activities between spermatozoa and cauda epididymal fluids.

The spermatozoa were found to be characterized by good motility parameters (values for TMOT and PMOT were 88.1 ± 3.1 % and 52.5 ± 4.2 %, respectively). High sperm kinematic parameters were also demonstrated, especially in case of VAP, VSL and VCL. Sperm homogenates showed higher ($P < 0.05$) SOD and CAT activity in comparison with cauda epididymal fluid (0.605 ± 0.02 vs. 1.54 ± 0.2 U/mg and 1.15 ± 0.2 vs. 6.40 ± 1.5 U/min/mg, respectively). In case of GPx activity, such dependence was not demonstrated.

Based on the assessment of the sperm motility parameters and the presence of antioxidant enzymes in the epididymal semen, we concluded that spermatozoa collected *post mortem* from the epididymis could be used in the technology of red deer semen preservation.

Supported by UWM (grant no. 11.610.003–300) under the Agreement with the Nowe Ramuki Forest District.

Ekspresja genów związanych z apoptozą w tkance jądrowej kota domowego (*Felis catus*) w aspekcie sezonowości i morfologii nasienia

Expression of apoptosis-related genes in the testicular tissue of domestic cat (*Felis catus*) in relation to seasonality and sperm morphology

Prochowska S.*, Partyka A., Nizański W.

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław;

*sylwia.prochowska@upwr.edu.pl

Apoptoza pełni istotną rolę podczas spermatogenezy, odpowiadając m. in. za eliminację wadliwych plemników. Upośledzenie tego procesu może odpowiadać za częste występowanie teratospermii u kotowatych (Jewgenow i wsp., 2009, *J Androl*). Hipoteza ta nie została dotąd potwierdzona na poziomie ekspresji genów. U wielu gatunków stwierdzono nasilenie procesów apoptotycznych w tkance jądrowej podczas regresji jąder poza sezonem rozrodczym (Jiménez i wsp., 2015, *Sex Dev*). Nie istnieją podobne dane odnośnie kota domowego, a doniesienia dotyczące sezonowości u kocurów są niejednoznaczne (Blottner i wsp., 2007, *Reprod Domest Anim*). Celem doświadczenia było zbadanie, czy stopień nasilenia apoptozy w jądrach kota domowego jest różny w zależności od sezonu rozrodczego oraz teratospermii.

Materiał stanowiło 18 próbek tkanki jądrowej: 6 próbek pobranych w okresie rozrodczym (marzec-wrzesień) od kotów wykazujących normospermie, 6 próbek pobranych w okresie rozrodczym od kotów wykazujących teratospermie oraz 6 próbek pobranych poza okresem rozrodczym (grudzień-luty) od kotów wykazujących teratospermie. W próbkach zbadano względną ekspresję (metoda Pfaffla) genów kodujących białka związane z regulacją apoptozy w jądrach: FAS i FAS ligand oraz ekspresję genów kodujących kaspazę 3, kaspazę 9 oraz kaspazę 10. Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy ANOVA.

U kotów teratospermicznych kaspaza 10 wykazywała istotnie wyższą ($P < 0,05$) ekspresję poza sezonem rozrodczym, niż w sezonie. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic ($P > 0,05$) w ekspresji pozostałych badanych genów. Nie wykazano również różnic w ekspresji genów pomiędzy kotami normo- i teratospermicznymi w sezonie rozrodczym ($P > 0,05$).

Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że hamowanie spermatogenezy poza okresem aktywności płciowej modulowane jest przez procesy apoptotyczne na drodze zewnątrzpoходnej (angażującej kaspazy 8 i 10). Otrzymane wyniki nie pozwalają na potwierdzenie roli apoptozy w powstawaniu specyficznej gatunkowo dla kota domowego teratospermii.

Badania finansowane ze środków dotacji statutowej Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu nr B030/0045/16.

WYKŁAD OTWIERAJĄCY

Endogenne kanabinoidy a regulacja sekrecji GnRH/LH
Endogenous cannabinoids and regulation of GnRH/LH secretion

Tomaszewska-Zaremba D.

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna;

d.tomaszewska@ifzz.pl

Pomimo, że kanabinoidy i ich działanie są znane od tysiącleci, dopiero niedawno w literaturze naukowej opisano endogenne system kanabinoidów w organizmach ludzi i zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem obecności tych związków w Ośrodkowym Układzie Nerwowym (OUN). Układ ten moduluje szereg fizjologicznych i psychicznych funkcji ważnych dla życia, między innymi procesy rozrodu. Głównymi endokannabinoidami są arachidonoilietanolamid (anandamid) i 2-arachidonyloglicerol. Związki te działają poprzez swoje receptory rozmieszczone zarówno w mózgu, jak i tkankach obwodowych.

Z badań opisanych w literaturze znany jest negatywny wpływ kanabinoidów na reprodukcję u gryzoni, naczelnych i u ludzi. Sądzi się, że kluczową rolę w tym zjawisku odgrywa hamujący wpływ kanabinoidów na sekrecję GnRH. Sekrecja GnRH jest regulowana przez wiele czynników, które obejmują neurotransmitery, neurohormony i peptydy o działaniu zarówno stymulującym, jak i hamującym. Najważniejsze z nich to: prostaglandyny, noradrenalina, dopamina, kwas γ -aminomasłowy (GABA), β -endorfina, neuropeptyd Y i kortykoliberyna.

Dużą rolę w hamującym mechanizmie działania endokannabinoidów na sekrecję GnRH/LH przypisuje się układowi GABA-ergicznemu i prostaglandynom. Obecna hipoteza zakłada, że endokannabinoidy biorą udział w regulacji sekrecji GnRH przez steroidy gonadowe poprzez długą pętlę sprzężenia zwrotnego wpływając na neurony GABA. W procesie tym biorą udział również prostaglandyny wytwarzane w OUN. Nie wykluczone jest jednak bezpośrednie oddziaływanie endokannabinoidów na neurony GnRH. Pomimo, iż główne działanie endokannabinoidów na sekrecję GnRH/LH zachodzi na poziomie podwzgórza możliwe jest również bezpośrednie ich oddziaływanie na poziomie przysadki. Opisano zarówno ekspresję kanabinoidów, jak i miejsc ich wiązania oraz obecność enzymów syntetyzujących i hydrolizujących kanabinoidy w *pars distalis* przysadki, jak i w kulturach komórek przysadki.

Praca finansowana ze środków NCN, grant 2013/11/B/NZ9/00708.

***In vitro* effect of NPY on basal and GnRH-induced LH secretion from pituitary cells during early pregnancy in the pig**

Wpływ NPY na podstawową i indukowaną przez GnRH sekrecję LH *in vitro* przez komórki przysadki podczas wczesnej ciąży u świni

Siawrys G.*, Buchowski H., Bogacka I.

Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury, Olsztyn;

*gabri@uwm.edu.pl

Neuropeptide Y (NPY), a 36-aminoacid peptide, is implicated in the regulation of number functions in mammalian physiology *e.g.* in reproduction. It acts through the hypothalamic–pituitary axis, after binding to its receptors. So far only a few studies focused on NPY influence on LH release from porcine anterior pituitary (AP) cells but data concerning this aspect of NPY activity in pregnant pigs is still missing. Therefore, the aims of the research, carried out on porcine experimental model during early pregnancy (14–16 days — beginning of implantation), were: 1) to examine the effects of NPY on basal and GnRH-induced LH secretion by pituitary cells as well as basal and GnRH-induced LH contents in these cells, 2) to localize NPY receptors (Y1, Y2) gene expression in the AP gland.

Isolated AP cells after preliminary culture (72 h) were treated for 3.5 h: with GnRH (100 ng/ml; positive control) or NPY (10^{-8} – 10^{-6} M — each of doses alone or with GnRH, 100 ng/ml) and without hormones (negative control). LH concentrations in the culture media and cellular homogenates were determined by RIA. The AP NPY receptors gene expression was analyzed by Real-time PCR. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by the least significant difference (LSD) *post hoc* test (STATISTICA 6.0 PL).

It was shown that NPY had no effect on basal LH secretion by porcine AP cells on 14–16 days of gestation. Both doses 10^{-8} and 10^{-7} M of NPY in combination with GnRH suppressed LH release compared to GnRH alone. Moreover, NPY did not alter basal and GnRH-stimulated LH intracellular accumulation in these cells. The results revealed the presence of Y1 and Y2 in the porcine AP gland.

These data indicate that NPY is not involved in the regulation of basal and GnRH-induced LH accumulation as well as basal LH secretion but might modulate GnRH-induced release from porcine pituitary cells during early pregnancy.

Supported by the State Committee for Scientific Research (projects: No PBZ KBN-084/P06/2002, No 0206.0805 and 12.610–005–300).

Zmiany dzień/noc oraz wpływ stanu zapalnego na sekrecję gonadotropin i ekspresję receptora GnRH w guzowatej części przysadki owcy

Day/night changes and the effect of inflammation on the secretion of gonadotropins and the expression of GnRH receptors in the *Pars Tuberalis* of ewe

Wojtulewicz K.*, Tomaszewska-Zaremba D., Krawczyńska A., Herman A.P.

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna;

*k.wojtulewicz@ifzz.pl

Część guzowata (*Pars Tuberalis*, *PT*) wspiera i reguluje aktywność sekrecyjną komórek zlokalizowanych w części dalszej. Obecność w *PT* komórek wydzielających hormon luteinizujący (LH) i folikulotropowy (FSH) oraz komórek wykazujących ekspresję receptorów melatoninowych sugeruje udział *PT* w sezonowej regulacji rozrodu. Wcześniejsze prace wykazały wysoką ekspresję receptorów mediatorów zapalnych w komórkach *PT*, dlatego można przyjąć, że stan zapalny może wpłynąć na lokalną sekrecję gonadotropin w tej części przysadki. Celem badań było określenie wpływu stanu zapalnego na syntezę gonadotropin i ekspresję receptora GnRH w *PT* owcy, biorąc pod uwagę zarówno status rozrodczy zwierząt, jak i porę doby (dzień/noc).

Przeprowadzono 2 analogiczne eksperymenty na owcach w fazie *anestrus* (n=24) i w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego (n=24). W każdym eksperymencie zwierzęta podzielono na 2 grupy (n=12) ze względu na warunki fotoperiodyczne (dzień/noc) oraz dwie podgrupy- zwierzęta kontrolne (n=6) i zwierzęta traktowane LPS (400 ng/kg; *i.v.*, n=6). Iniekcję NaCl/LPS wykonano odpowiednio 2 godz. po wschodzie lub zachodzie słońca. W pobranych fragmentach *PT* za pomocą metody Real-Time PCR oznaczono ekspresję genów *LHβ*, *FSHβ* i *GnRHR*, natomiast poziom ekspresji białek tych genów oznaczono techniką Western blot. Analizy statystyczne przeprowadzono metodą dwuczynnikowej wariancji ANOVA, oraz testem post-hoc Fisher'a.

Wykazano, że ekspresja LH w *PT* zależy zarówno od pory doby, jak i statusu rozrodczego zwierzęcia. Stan zapalny hamuje ($P<0,05$) ekspresję LH w *PT* tylko w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego. Stwierdzono, że ekspresja genu *FSHβ* w *PT* jest niższa w ciągu nocy ($P<0,05$) niezależnie od statusu rozrodczego zwierząt, a stan zapalny nie wpływa na ekspresję tego genu. Stwierdzono, że stan zapalny hamuje ($P<0,05$) ekspresję *GnRHR* w nocy w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego.

Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno ekspresja gonadotropin w *PT* owcy, jak i jej wrażliwość na działanie stanu zapalnego, zależy od pory doby oraz statusu rozrodczego zwierzęcia.

Czy neurotransmisja sygnału światła w podwzgórzu samca mieszańca świni domowej i dzika może być modulowana poprzez endogenne tlenek węgla?

Is it possible to modulate light neurotransmission in the hypothalamus of male domestic pig and wild boar crossbred by the endogenous carbon monoxide?

Gilun P.^{1,*}, Lewicka M.¹, Wąsowska B.¹, Koziorowska-Gilun M.², Kozioł K.³, Koziorowski M.³

¹*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie;*

²*Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;*

³*Uniwersytet Rzeszowski, Pozawydziałowy Instytut Biotechnologii;*

*p.gilun@pan.olsztyn.pl

Celem badań było określenie wpływu podwyższonego poziomu endogennego tlenku węgla (CO) we krwi infundowanej do żyły kątowej oka na ekspresję wazopresyny i VIP w strukturach podwzgórza będących częścią osi siatkówkowo-podwzgórzowo-szyszynkowej (RHP) odpowiedzialnej za transmisję sygnału światła.

Badania prowadzono w czasie: długiego dnia świetlnego (czerwiec) oraz krótkiego dnia świetlnego (grudzień). W doświadczeniu wykorzystano 24 dojrzałe samce mieszańców dzika i świni domowej. Do żyły kątowej oka infundowano autologiczną krew, naświetlaną w celu podniesienia endogennego poziomu CO — w grupie doświadczalnej (n=6), oraz płynu fizjologicznego — w grupie kontrolnej (n=6). Ekspresję wazopresyny i VIP badano w obszarach przedwzrostowym (POA), grzbietowym (DH) i brzuszno-tylnym (VH) podwzgórza przy użyciu metod: Real Time PCR oraz Western blot. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (test Kruskal-Wallis'a dla grup o rozkładzie nienormalnym).

W POA wykazano:

Wzrost ekspresji VIP w grupie doświadczalnej w czerwcu na poziomie genu i białka natomiast w grudniu wykazano wzrost na poziomie białka.

Wzrost ekspresji wazopresyny w grupie doświadczalnej wykazano w grudniu, natomiast w czerwcu zaobserwowano spadek ekspresji tego genu w stosunku do kontroli. Na poziomie białka zaobserwowano spadek ekspresji wazopresyny w czerwcu.

W DH wykazano:

Wzrost ekspresji genu VIP w grupie doświadczalnej obserwowano w czerwcu i grudniu natomiast na poziomie białka wykazano wzrost ekspresji tylko w grudniu

Spadek ekspresji wazopresyny na poziomie białka w grupie doświadczalnej w grudniu

W VH wykazano:

Spadek ekspresji wazopresyny w grupie doświadczalnej na poziomie genu i białka w czerwcu, natomiast w grudniu wykazano spadek ekspresji tylko na poziomie białka.

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na modulujący wpływ tlenku węgla na ekspresję neurotransmiterów sygnału światła w podwzgórzu zwierząt doświadczalnych. Zmiany w ekspresji badanych czynników będących częścią osi RHP sugerują również wpływ na inne szlaki regulacyjne biorące swój początek w podwzgórzu m. in. oś podwzgórzowo-przysadkową.

Badania finansowane ze środków statutowych Zakładu Lokalnych Regulacji Fizjologicznych IRZiBŻ PAN w Olsztynie oraz grantu KBN nr NN311100133.

WYKŁAD OTWIERAJĄCY

Tajemnice łożyska
The secrets of placenta

Kankofer M.

Katedra Biochemii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie;

marta.kankofer@up.lublin.pl

Łożysko to unikalny narząd tworzony tylko na czas ciąży i pozostający pod ścisłą kontrolą zarówno ze strony matki, jak i płodu. Poszczególne etapy tworzenia łożyska oraz jego funkcje obejmujące między innymi wymianę składników odżywczych oraz sekrecję biologicznie czynnych związków są podobne bez względu na gatunek i budowę histologiczną chociaż przebiegają w różnym zakresie i różnych ramach czasowych.

Z biochemicznego punktu widzenia poszczególne etapy rozwoju łożyska i jego funkcje to zbiór reakcji przebiegających bardziej lub mniej cyklicznie obejmujących cząsteczki o charakterze strukturalnym oraz te biologicznie czynne. Zapis o strukturze i właściwościach tych związków znajduje się w DNA, natomiast ekspresja poszczególnych genów pozostaje pod kontrolą hormonalną. Wiele z tych zależności wymaga nadal wyjaśnienia.

Duże znaczenie należy przypisać profilowi białkowemu tkanek łożyska, który obejmuje nie tylko cząsteczki o charakterze strukturalnym, ale także substancje biologicznie czynne pełniące rolę regulacyjną, sygnałową czy katalityczną. Lista tych białek nadal nie jest kompletna. Metabolizm białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz aktywność metaloproteinaz pozostające pod kontrolą progesteronu stanowią kluczowe procesy nie tylko implantacji, ale także oddziaływania na granicy pomiędzy częścią maczyną i płodową. Prawidłowa przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej w czasie ciąży wpływa na fizjologiczny przebieg ciąży. Właściwa koordynacja aktywności biologicznej tych cząsteczek odbywająca się także z udziałem związków o budowie innej niż białkowa warunkuje nie tylko prawidłowy rozwój łożyska, ale także płodu.

Nadal bez odpowiedzi pozostaje pytanie o przewidywanie terminu porodu, a tym samym mechanizmów leżących u podstaw terminacji aktywności łożyska. Podobnie biochemiczne reakcje odpowiedzialne za prawidłowe odklejenie błon płodowych wymagają wyjaśnienia.

Analiza metabolizmu wszystkich białek łożyska oraz ich regulacji mogą przynieść odpowiedzi na pytania o markery prawidłowego przebiegu ciąży, terminu porodu czy kontroli odklejania łożyska i wyjaśnić tajemnice łożyska.

Expression of selected genes and proteins in monocultures of different placenta cell lines and their co-cultures with adrenal H295R cells, reflecting *in vitro* fetoplacental unit

Ekspresja wybranych genów i białek w łożyskowych liniach komórkowych hodowanych w monokulturze lub kokulturze z nadnerczową linią H295R, odzwierciedlających w warunkach *in vitro* jednostkę płodowo-łożyskową

Drwal E.* , Rak A., Gregoraszczyk E.Ł.

*Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu; Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych,
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie;*

*eliza.drwal@doctoral.uj.edu.pl

Our previous study shown cooperation between placental (JEG-3, BeWo, syncBeWo) and adrenal (H295R) cells in secretion of pivotal pregnancy hormones such as: progesterone (P4), estradiol (E2) and human chorionic gonadotropin (hCG), suggesting that this models can be useful for study fetoplacental steroidogenesis. In the present study, we characterized expression of steroid receptors (estrogen — ER α/β , progesterone — PR), aryl hydrocarbon receptor (AhR), cytochrome P450, family 1, member A1 (CYP1A1) and catechol-O-methyl transferase (COMT) genes and proteins expression in co-culture models and compared results with monocultures.

H295R cells were cultured in 24-well plates, while placental cells on transwell membrane inserts with 0.4 μ m pores in separate plates for each cell type for 24 h. After this time, media were removed and inserts with placental cells were placed into the wells with H295R cells in co-culture medium for the next 24, 48 or 72 h. At the end of culture gene and protein expression were determined by RT-PCR or Western blot. Results were analysed by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

In all co-culture models the expression of all tested genes and proteins increased with time of culture. There were no differences between JEG-3 and BeWo in the expression of PR; however, it was higher in BeWo compared to syncBeWo. All models had greater expression of ER α than ER β . AhR expression in JEG-3 and syncBeWo was greater than in BeWo. The profiles of CYP1A1 and COMT expression in JEG-3 and BeWo models were comparable, while greater expression was noted in syncBeWo.

We suggest that the model of JEG-3 or BeWo with H295R, showing high steroidogenic activity, could be useful for studying endocrine properties of feto-placental unit, while syncBeWo, exhibiting high expression of AhR, CYP1A1 and COMT could be useful for studying metabolism in human placenta.

Supported partly by 2/2016, Society for Biology of Reproduction and partly by K/ZDS/005404, Jagiellonian University in Krakow.

Wpływ miR-125b na ekspresję wybranych genów docelowych w komórkach trofoblastu świni

Effect of miR-125b on the expression of selected target genes in porcine trophoblast cells

Najmuła J., Nitkiewicz A., Kaczmarek M.M.*

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;

*m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl

Podczas wczesnej ciąży, w świetle macicy obecnych jest wiele aktywnych biologicznie molekuł wywierających wpływ zarówno na tkanki zarodka, jak i endometrium. Ostatnie badania wskazują na istotną w tym okresie rolę miRNA — krótkich, niekodujących cząsteczek RNA, zdolnych do regulacji ekspresji genów. Dotychczas udało nam się zidentyfikować cząsteczki miRNA potencjalnie zaangażowane w procesy towarzyszące wczesnej ciąży, które ulegają zmiennej ekspresji w kolejnych etapach rozwoju zarodka. Do dalszych badań wyłoniony został miR-125b, który uznano za interesujący ze względu na geny docelowe, których ekspresję może regulować, tj. receptor czynnika hamującego białaczkę (*LIFR*), receptor interleukiny 6 (*IL6R*) oraz białka *SCARB1* i *BCL2*. Na modelu *in vitro* oceniono wpływ miR-125b na ekspresję ww. genów w komórkach trofoblastu świni.

Komórki trofoblastu (n=3, 14.-16. dzień ciąży [DP]) transfekowano miR-125b (25 i 50 nM) oraz sekwencją kontrolną (ang. *control mimic*, CM; 50 nM), w celu określenia ekspresji miR-125b oraz jego genów docelowych metodą real-time PCR.

Transfekcja spowodowała ponad 2100 i 2500 krotny wzrost ekspresji miR-125b, odpowiednio po zastosowaniu dawek 25 i 50 nM (vs. CM). Zaobserwowano również spadek ekspresji *IL6R* (50 nM miR-125b vs. CM; one-way ANOVA $P=0,0482$), podczas gdy ekspresja *LIFR*, *SCARB1* i *BCL2* pozostała niezmieniona.

Zważywszy na rolę, jaką odgrywa IL6 podczas wczesnej ciąży: 1) stymulując proliferację oraz przyleganie zarodka świni *in vitro* (Blitek i wsp., 2012, *Theriogenology*), 2) umożliwiając inwazję trofoblastu u ludzi (Champion i wsp., 2012, *Mol Hum Reprod*), a także biorąc pod uwagę obserwowaną niską ekspresję *IL6R* w 18DP (Blitek i wsp. 2012, *Theriogenology*), przy jednoczesnym wzroście poziomu miR-125b pomiędzy 16 a 20 DP (Krawczyński i wsp., 2015, *Biol Reprod*), wydaje się prawdopodobne, że miR-125b jest zaangażowany w obniżenie wrażliwości zarodka na IL6, konsekwentnie regulując jego zdolności przylegania, bądź inwazyjność.

Praca finansowana ze środków NCN 2014/15/B/NZ9/04932.

The influence of restricted nutrition of female in periconceptional period on the level of DNA methylation of the endometrium during the implantation

Wpływ restrykcyjnego żywienia samic w okresie okołozapłodnieniowym na poziom metylacji DNA endometrium podczas implantacji

Zglejc K.*, Marciniak M., Waszkiewicz E., Kotwica G., Franczak A.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*kamila.zglejc@uwm.edu.pl

Females' undernutrition during periconceptional period affects transcriptomic profile of the endometrium and determines the potential to DNA methylation in the uterus. We found that in consequences intrauterine milieu of estradiol-17 β during the peri-implantation period may be changed. We hypothesized that in females fed a restricted diet the level of DNA methylation in the endometrium may be impaired. The aim of this study was to determine the level of methylation of genes in the endometrium harvested during the peri-implantation period from gilts fed restricted diet, in which the protein and energy content was reduced by 30 % (n = 4) or normal diet (n = 4), according to Norms for Nutrition of Pigs (PL, 1993) during peri-conceptional period.

We found that down-regulated genes in the endometrium, as a result of restricted diet, are involved in DNA methylation (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1; DNMT1*), steroid hormones synthesis (*type 4 17 β -hydroxysteroid; HSD17 β (4)*), immune response (*toll-like receptor 3; TLR3*), co-activation of P₄ receptor (*high mobility group box 2; HMGB2*) and metabolic homeostasis (*adiponectin receptor 1; ADIPOR1*). The quantitative Methylation Specific PCR (qMS-PCR) allowed to determine the level of DNA methylation occurred in promoter regions. We designed primers to distinguish methylated from unmethylated sequences of DNA in bisulfate-modified DNA. The methylation rate was calculated using the mathematical formula, $C_m = 100/[1 + 2^{(C_M^{CT} - C_{UM}^{CT})}]$ %. Differences in methylation level between the normal- and the restricted-diet-fed gilts were analyzed using Tukey's HSD for one-way ANOVA.

The qMS-PCR indicated that selected down-regulated genes in the endometrium of normal- and restricted-diet-fed gilts were partially methylated and unmethylated (approx. 50%:50%). Restricted diet resulted in decreased ($P \leq 0.05$) expression of methylated sequence of *ADIPOR1* in the endometrium harvested from restricted-diet-fed gilts when compare to normal-diet-fed gilts, but did not affect the methylation rate of other selected genes.

Our results may suggest that down-regulation of selected genes in the endometrium as the results of restricted diet is not correlated with the level of DNA methylation directly.

Supported by the grant PRELUDIUM no. 2015/19/N/NZ9/02428 funded by National Science Center, Poland.

PREZENTACJE POSTEROWE

**Lineage-specific transcription factors expression during development
of trophectoderm in rabbit embryos**
**Ekspresja specyficznych dla danych linii komórkowych czynników transkrypcyjnych
podczas rozwoju trofektoderm w zarodkach królika**

Barłowska K.^{1,*}, Madeja Z.E.², Pawlak P.², Piliszek A.¹

¹*Institute of Genetics & Animal Breeding of Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec;*

²*Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Poznań;*

*k.barlowska@ighz.pl

The trophectoderm (TE) is the first differentiated cell line in mammalian embryogenesis. During subsequent development TE forms the embryonic part of the placenta, which is a unique structure that provides environment for a fetal development. Disorders in the development of the trophectoderm inhibit the development of the embryo. However, there are interspecies differences. That is why research in the field of developmental biology, requires studies on different species. The mechanism of the differentiation of trophectoderm is associated with the polarization of the embryo and the activation of appropriate signaling pathways. Transcription factors present from the onset of TE differentiation in the mouse embryo are Cdx2, Gata3 and Eomesodermin (Eomes), while transcription factors associated with the inner cell mass (ICM) and pluripotency are Nanog, Oct4, Sox2. Cdx2 is already present at the 8-cell stage, and Gata3 and Eomes at the 16-cell stage in the mouse embryo, and all these factors are detected in all TE cells in the mouse blastocyst. The aim of the study was to analyze the expression and localization of lineage-associated transcription factors (previously identified in the mouse) during trophectoderm specification in the rabbit embryos.

The embryos used in the study (n = 40) were flushed *in vivo* at appropriate stages (morula: E2.0, E3.0; blastocyst: E3.5, E4.0, E4.5, E5.0), fixed, stained with antibodies (immunostaining) and examined by confocal microscopy.

The results of the present study show, that in the rabbit embryo Cdx2 starts to be visible in early blastocyst stage in single TE cells, and later is detectable in all TE cells in sorted rabbit blastocyst. In the rabbit E3.5 embryos, Gata3 and Eomes were not detected, while most of the cells (including TE) expressed Oct4. Gata3 was first observed in E4.5 embryos and at E5.0 was expressed in all TE cells. The rabbit embryos seem to form blastocyst without expression of transcription factors associated with TE in the mouse embryos (Cdx2, Gata3, Eomes). In the rabbit E4.0 embryos, Oct4 is present in all cells of the trophectoderm, which can suggest that rabbit TE may remain pluripotent to the late blastocyst stage.

In summary, there are significant differences in the expression of these factors between mouse and rabbit embryos and mechanism specifying TE has to be further studied.

This work is supported by National Science Centre (NCN) grant number 2011/03/D/NZ3/03992 and Leading National Research Centre (KNOW), Scientific Consortium "Healthy Animal — Safe Food".

Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E₂ in the early and late cleaved bovine embryos at different stages of preimplantation development

Ekspresja enzymów zaangażowanych w syntezę prostaglandyny E₂ we wcześnie i późno dzielących się zarodkach bydłych w różnych stadiach przedimplantacyjnego rozwoju

Boruszewska D.*, Grycmacher K., Kowalczyk-Zięba I., Sinderewicz E., Staszkievicz J., Woławek-Potocka I.

Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*d.boruszewska@pan.olsztyn.pl

Prostaglandin E₂ (PGE₂) plays an important role in early embryo development and the establishment of pregnancy in the cow. The aim of the study was to investigate the mRNA expression of enzymes involved in the synthesis of PGE₂ in the bovine embryos.

Real-time PCR was used to examine the expression of enzymes involved in PGE₂ synthesis: prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2) and prostaglandin E synthases: microsomal PGESs (*mPGES-1*, *mPGES-2*) and cytosolic PGES (*cPGES*) in morulas, early, developed, expanded and hatched blastocysts, derived from good and poor quality oocytes (early and late cleaved embryos, 6 replicates in each group). The good quality embryos cleave early — till 30 h post-fertilization, whereas embryos with poor quality cleave 6 h later. Obtained data were analyzed using two-way ANOVA test (GraphPad PRISM 6.0. Software).

We found the dynamic changes in mRNA abundance for all analyzed enzymes in the early and late cleaved embryos at examined stages (morulas and blastocysts) of their *in vitro* preimplantation development. The mRNA level of PTGS2 was significantly higher in expanded grade C and hatched blastocysts compared to other analyzed types of blastocysts from the late cleaved group. Moreover, we showed significantly higher PTGS2 expression in the expanded grade C and hatched blastocysts from late than early cleaved embryos. In turn, mRNA abundance of *mPGES-1* at morula stage was significantly higher in late cleaved group type C than in type A. In type C morulas we also found higher mRNA expression of *mPGES-2* from late than early cleaved embryos. There was higher mRNA expression of *mPGES-2* in expanded type C blastocysts compared to all analyzed stages of early cleaved embryos except the early type C blastocysts. The level of *cPGES* transcripts was higher in early types A and B, developed type C as well as expanded types B and C blastocysts from late than early cleaved embryos.

Summarizing, the conducted research accounts for dynamic changes of mRNA levels for enzymes involved in PGE₂ synthesis during early stages of embryo development, displaying different expression profiles in early *versus* late cleaved embryos.

Supported by Polish National Science Centre: 2014/13/N/NZ9/03924.

Zróźnicowanie dystrybucji selenu i obrazu morfologicznego plemników: porównanie głowy, trzonu i ogona najądrzy dzików (*Sus scrofa* L.)

Epididymal differences in selenium distribution and morphological patterns of wild boar (*Sus scrofa* L.) spermatozoa: a comparison of the head, corpus and cauda regions

Gączarzewicz D.^{1,*}, Udała J.¹, Bąkowska M.¹, Pilarczyk B.¹, Tomza-Marciniak A.¹, Błaszczuk B.¹, Stankiewicz T.¹, Piasecka M.²

¹Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie;

²Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin;

*dariusz.gaczarzewicz@zut.edu.pl

Celem badań było określenie stężenia selenu w jądrach i najądrzach dzików (*Sus scrofa* L.) oraz analiza zmian morfologicznych plemników w poszczególnych segmentach najądrza.

Materiał do badań pozyskano od 16 samców (wiek 2–4 lata) odstrzelonych w okresie od listopada 2011 r. do marca 2012 r. na terenie województwa zachodniopomorskiego. Zawartość Se w homogenatach tkankowych jąder oraz głowy, trzonu i ogona najądrzy (uwzględniając narządy prawej i lewej strony ciała) oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem 2,3-diaminonaftalenu (DAN). Do analizy morfologii plemników najądrzowych zastosowano barwienie negatywowe (roztworem nigrozyny) przeprowadzając ocenę plemników z uwzględnieniem proksymalnej i dystalnej części ogona najądrzy.

W badaniach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w zawartości Se w jądrach i segmentach najądrzy pomiędzy lewą i prawą stroną ciała oraz pomiędzy stężeniem Se w narządach młodszych i starszych samców (odpowiednio do 3. i >3. roku życia). W jądrach średnie stężenie Se wynosiło $0,33 \pm 0,06 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ m.m. Zbliżoną koncentrację Se wynoszącą średnio $0,25 \pm 0,11$ i $0,25 \pm 0,06 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ m.m. odnotowano odpowiednio w głowie i trzonie najądrzy. W ogonie najądrzy stężenie pierwiastka było istotnie wyższe ($P < 0,01$ vs głowa oraz trzon narządu) i wynosiło $0,36 \pm 0,11 \mu\text{g} \times \text{g}^{-1}$ m.m. We wszystkich analizowanych segmentach najądrzy, przy dużej zmienności osobniczej, zaobserwowano znaczny udział plemników wykazujących zmiany w budowie morfologicznej. W głowie najądrzy nie stwierdzono obecności prawidłowych morfologicznie gamet, natomiast w dystalnej części ogona ich udział wynosił średnio $20,69 \pm 9,66\%$. Ponadto, w dystalnych przewodach najądrzy wzrastał odsetek plemników z prawidłowym akrosomem.

Analiza występowania oraz rodzaje zaobserwowanych zmian morfologicznych plemników wskazują na zachodzące procesy morfologicznego różnicowania plemników podczas ich przemieszczania się przez poszczególne segmenty najądrza dzików, co może mieć związek z różną dystrybucją Se w narządzie.

Influence of the prostatic fluid on spermatozoa recovery from the canine cauda epididymis and its survival at 4°C — preliminary results

Wpływ płynu prostaty na odzysk plemników z ogona najądrza psa i ich przeżywalność w temperaturze 4°C — badania wstępne

Młynarczyk A., Konieczna K., Kochan J., Nowak A., Młodawska W.*

Institute of Veterinary Sciences, University of Agriculture in Krakow;

*rzmlodaw@cyf-kr.edu.pl

After the sudden death of animals of high genetic value or routine castration, the cauda epididymis represents one of the major sources of spermatozoa which can be frozen and used for *in vitro* embryo production many years later. The aim of the study was to use the prostatic fluid (PF) to optimize the protocol for obtaining sperm from the canine cauda epididymis and assess its effect on sperm recovery, motility and viability at 4 °C.

The cauda epididymis obtained after castration of 8 dogs and PF from 4 ejaculates of different fertile dogs were used in the study. One cauda epididymis from each pair was placed in 1 ml of PF, the second in Tris extender with 10% PF. Sperm suspensions were collected after incision and the procedure was repeated. After evaluating sperm cells count the semen was placed in equal portions into 3 test tubes. Each sample was filled up to 3 ml to obtain certain PF concentration: 10%, 50% or 100% and stored at 4 °C. Sperm motility and viability (using YO-PRO-1/PI staining) were estimated at collection and every 24 hours, until <10% of sperm in the sample exhibited progressive motility (PM). ANOVA followed by Tukey's test were used for statistical analysis.

It was found that the use of PF to obtain sperm from the canine cauda epididymis enables recovery of a greater number of gametes as compared to Tris extender with 10% PF (avg. 267.913×10^6 vs 172.225×10^6 spermatozoa/ml, respectively; $P < 0.01$) and has a positive effect on sperm motility at collection. However, after the 2nd day of storage in 100% PF, the percentage of PM and viable sperm was significantly lower than in Tris extender with 10% or 50% PF.

To sum up, the prostatic fluid can be used to obtain spermatozoa from the canine cauda epididymis but undiluted PF is not recommended for short-term storage due to its negative effect on sperm motility and viability. Further research is needed to determine the dose of PF optimal for storage of dog epididymal sperm at 4 °C.

Financed from DS 3208.

**Bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and follicle-stimulating hormone (FSH)
in the dominant and atretic ovarian follicles of cows**

**Białko morfogenetyczne kości-15 (BMP-15) i hormon folikulotropowy (FSH)
w dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych krów**

Mościcki W.*, Błaszczuk B., Stankiewicz T., Udała J., Gączarzewicz D.

*Department of Animal Reproduction Biotechnology and Environmental Hygiene,
Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology, Szczecin;*

*wojciech.moscicki@zut.edu.pl

The correct course of folliculogenesis is conditioned by complex internal control mechanisms which, with systemic signals, influence the recruitment, selection and development of follicles to the ovulatory stage. More advanced stages of follicular development depend on properly functioning endocrine signals, especially pituitary gonadotropins like follicle-stimulating hormone (FSH), which interact with numerous locally synthesized factors. These factors include, among others bone morphogenetic protein-15 (BMP-15). Therefore, the aim of this study was to determine and compare FSH and BMP-15 concentrations in the dominant and atretic follicles in cows of different ages.

The experiment was performed on 46 multiparous cows (2–18 years old). These females were slaughtered in a local slaughterhouse and were previously used for reproduction on a dairy farm. Only one ovary was allocated with large follicle (12–20 mm in diameter). Classification of ovarian follicles was performed after calculation of 17β -estradiol/progesterone ratio (E_2/P_4) and evaluation of the *corpus luteum* stage. Dominant follicles ($n=18$), pre-ovulatory follicles ($n=14$) and atretic follicles ($n=14$) were identified. Samples of blood were taken from each cow. Each cow was assigned one fluid sample and a corresponding serum sample. BMP15, FSH, P_4 and E_2 concentrations were determined in the samples. Statistical analyses were conducted using the STATISTICA version 7.1.

The highest concentration of BMP-15 was noted in the atretic follicles and it was significantly higher than in the dominant follicles ($P<0.05$). FSH concentration did not significantly differ between the groups of follicles. In younger cows, BMP-15 and FSH concentrations in follicles and serum were significantly lower than in older cows ($P<0.01$).

The results indicate that the concentration of BMP-15 and FSH depends on the status of the follicles and the age of the animals.

The apoptosis in parthenogenetic blastocysts of pig and cattle
Apoptoza w partenogenetycznych blastocystach świni i bydła

Pawlak P., Madeja Z.E., Lechniak-Cieślak D., Warzych E.*

Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Poznan;

*ewarzych@up.poznan.pl

Apoptosis is a gene-directed biological process, which leads to self-controlled cell death without inflammation. It plays an important role in embryo growth by controlling elimination of genetically incompetent cells (e.g., EGA failure, chromosome abnormalities). Although apoptosis is described as favorable for embryo quality, the borderline threshold beyond which this process becomes detrimental to embryo development has not yet been identified. Therefore, the aim of our study was to evaluate apoptosis and expression of apoptosis related genes in parthenogenetic (PA) embryos, a known model for derivation of the embryonic stem cells lines.

In the present experiment, apoptotic blastomeres have been detected with TUNEL according to the producer's recommendation (Promega), in bovine and porcine parthenogenetic blastocysts. Oocytes matured *in vitro* were activated with Ionomycin followed by 6DMAP treatment and cultured for 7–9 days in NCSU23 (porcine) or SOF (bovine) media. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics 24.0 (Kolmogorov-Smirnov test, apoptotic index with chi-square and Z test).

Only 20% of porcine blastocysts contained apoptotic blastomeres, whereas apoptotic cells were detected in all of the analyzed bovine embryos. The average apoptotic index (AI) was significantly lower in porcine (0.01%) than in bovine (12.5%; $P < 0.001$) embryos. Moreover, IVP bovine embryos show similar AI to PA (4.0–10%), in contrast to porcine IVP blastocysts, where AI is higher than in PA blastocysts (6–16%).

The observed species-specific differences in apoptosis in PA embryos may indicate putative disturbed pathways of apoptosis in porcine blastocysts. In order to provide data for proper interpretation of the observed discrepancies, analysis of mRNA expression of selected genes regulating apoptosis (e.g., *Bax*, *Bcl2*, *Bak*, *Caspase 3*) is currently in progress.

Supported by statutory fund (No 508.534.00.0), Poznan University of Life Sciences, Poland.

Follicular fluid during *in vitro* maturation of porcine oocytes affects the yield, quality and gene expression of day-7 parthenogenetic blastocysts

Wpływ dodatku płynu pęcherzykowego w pożywce do dojrzewania *in vitro* oocytów świni domowej na potencjał rozwojowy i ekspresję genów partenogenetycznych zarodków w stadium blastocysty

Pawlak P.*, Warzych E., Maciejewska E., Madeja Z.E., Lechniak-Cieślak D.

Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Poznan;

*piotr.pawlak@up.poznan.pl

The standard IVM medium for porcine oocytes has been routinely supplemented with follicular fluid (FF). This approach allows to perform the oocyte maturation in variable but controlled conditions depending on the FF origin. We have shown that fatty acid (FA) profiles of FF from prepubertal (P) and cyclic (C) gilts differ significantly and may influence oocyte quality. The FF from C gilts contains significantly more SFA as well as palmitic, stearic, oleic and linoleic fatty acids. Therefore, the aim of this study was to analyze the effect of FF from P and C gilts on quality of oocytes and day-7 parthenogenetic blastocysts.

Four groups of COCs (from P and C gilts matured in NCSU23 with FF of either P or C origin) were chemically activated and cultured to the blastocyst stage (7dpa). The effect of FF was expressed by the transcript level of 8 genes related to fatty acid metabolism in oocytes and blastocysts. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics 24.0 (Kolmogorov-Smirnov, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests).

Significant differences were observed in mRNA expression of 3 genes (*ACACA*, *SCD*, *FADS2*) between P and C oocytes matured in the autologous FF ($P < 0.05$). No differences were noticed in the transcript levels of the remaining 5 genes (*FADS1*, *ELOVL2*, *ELOVL5*, *FASN*, *PLIN2*). The effect of the FF origin became evident at the blastocyst stage. The *FASN*, *SCD* and *FADS1* gene expression was significantly lower ($P < 0.05$) in blastocysts originating from P oocytes matured in the autologous FF compared to the other 3 groups. Maturation of P oocytes with heterologous FF resulted in P blastocysts characterized by mRNA expression similar to that of C blastocysts displaying a similar mRNA level regardless the FF origin.

We assume that distinct fatty acid profiles in FF used for IVM, in a more pronounced way influences the quality of less competent P oocytes known as more susceptible to culture conditions. On the other hand, the quality of more competent oocytes of C gilts is not influenced by the FF origin.

Funding — MNiSW grant no 0051/IP1/2013/72.

**Mechanism of epiblast and primitive endoderm differentiation
in preimplantation rabbit embryos**

**Mechanizmy różnicowanie epiblastu i endodermy pierwotnej
w przedimplanacyjnych zarodkach królika**

Piliszek A.^{1,*}, Madeja Z.E.², Pawlak P.², Grabarek J.³, Plusa B.³

¹*Institute of Genetics & Animal Breeding of Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland;*

²*Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland;*

³*The University of Manchester, Manchester, UK;*

*a.piliszek@ighz.pl

During preimplantation development of mammalian embryos two consecutive cell fate decisions lead to differentiation of three distinct cell lineages: pluripotent epiblast (Epi), and extraembryonic primitive endoderm (PrE) and trophectoderm (TE). The formation of these lineages is necessary for the subsequent development of conceptus in utero. These processes have been extensively studied in the mouse, but little is known about this mechanism in other mammalian species. Here we present stage-by-stage analysis of the specification of the Epi and PrE during preimplantation development of the rabbit embryo.

The embryos developed in vivo (n=216) have been collected at different timepoints (E2.0-E6.0) and analyzed for mRNA expression (qPCR) or localization (immunofluorescence) of lineage-specific transcription factors. Rabbit embryos were also cultured in vitro up to blastocyst stage (n=76) in the presence of FGF4 or ERK inhibitor (ERKi), to uncover the role of FGF/ERK pathway in PrE/Epi specification.

We observed expression of Sox2 exclusively in Inner Cell Mass (ICM) and Epi lineage in all of the examined embryos, and expression of Nanog in both ICM and TE up to 4 days post coitum. PrE-associated transcription factor Sox17 was also presented in ICM only, while Gata6 was expressed in ICM, presumptive PrE and TE lineage. Our data further suggest that reciprocal repression of GATA6 and NANOG might not be essential for initiation of PrE versus EPI specification in the rabbit. Our functional studies of FGF/ERK signaling show decreased number of ICM cells after ERKi treatment, and indicate that FGF/ERK inhibition is not sufficient to sustain naive pluripotency in the rabbit epiblast.

These results suggest differences in PrE versus EPI specification and in mechanisms regulating pluripotency between different mammals.

Supported by National Science Centre (NCN) grant number 2011/03/D/NZ3/03992 and Leading National Research Centre (KNOW) Scientific Consortium "Healthy Animal — Safe Food".

**Wpływ saponin na morfologię nabłonka przewodu najądrza szczurów
z cukrzycą indukowaną streptozotocyną**
**Effect of saponins on epithelial morphology of epididymis in streptozotocin-
induced diabetic rats**

Rzeszotek S.*, Misiakiewicz-Has K., Pilutin A., Kolasa-Wołosik A., Wiszniewska B.

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie;

*sylwia.rzeszotek@pum.edu.pl

Cukrzyca, jako choroba ogólnoustrojowa oddziałuje również na układ płciowy mężczyzny. Do związków pochodzenia roślinnego, którym przypisuje się właściwości przeciwcukrzycowe należą saponiny (SAP). Celem badań było określenie wpływu saponin na zmiany związane z indukowaną streptozotocyną cukrzycą, występujące w obrębie nabłonka wyściełającego przewód najądrza szczura.

Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Sprague Dawley. Zwierzęta podzielono na 4 grupy liczące po sześć osobników. Zwierzęta miały stały dostęp do karmy wysokotłuszczowej. Po 2 miesiącach dwie grupy nastrzyknięto streptozotocyną (D1STZ) (30 mg/kg m.c.), przy czym grupie drugiej (D2STZ+SAP) włączono do diety saponiny (100 mg/kg m.c.). Dzienna dawka saponin została ustalona na podstawie literatury (Watcho i wsp., 2017, *BMC Complement Altern Med.*; Patel i wsp., 2012, *J Young Pharm*). Zwierzętom z grupy kontrolnej 1 (K1) podano bufor cytrynianowy, drugą grupę kontrolną suplementowano saponinami (K2SAP). Ocennę morfologiczną prowadzono na skrawkach najądrzy barwionych metodą PAS. Pomiar wysokości nabłonka najądrza wykonano przy użyciu programu LAS v4.4. Reakcję IHC wykonano z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko E-kadherynie, koneksynie 43 oraz winkulinie, białkom uczestniczącym w tworzeniu połączeń międzykomórkowych.

W nabłonku najądrza odnotowano zmiany tylko w poziomie ekspresji E-kadheryny. Wyraźny spadek intensywności reakcji barwnej wykazano w grupie STZ w porównaniu z K1. W grupie STZ+SAP odnotowano natomiast wzrost ekspresji E-kadheryny, w porównaniu z grupą STZ. Stwierdzono wyższą o około 15% liczbę komórek halo w grupie STZ w porównaniu z K1, a dodatkowo w grupie STZ+SAP spadek liczby tych komórek o około 10%, w odniesieniu do STZ. Wykazano też zmniejszenie wysokości nabłonka najądrza u szczurów cukrzycowych, a także zmniejszenie ilości substancji PAS-pozytywnej w cytoplazmie w porównaniu z K1.

Podsumowując, cukrzyca ma negatywny wpływ na morfologię komórek nabłonka, powodując zmiany w ekspresji E-kadherynie, wysokości nabłonka, liczby limfocytów śródnabłonkowych oraz gromadzenia wydzieliny. Analiza wstępna sugeruje, że saponiny mogą częściowo niwelować skutki długotrwałej hiperglikemii.

Praca finansowana ze środków statutowych.

Waiting for sperm does not pay off. Effects of postovulatory aging on developmental potential of mouse oocytes

Nie warto czekać na plemnik: wpływ starzenia poowulacyjnego na potencjał rozwojowy oocytów myszy

Sabat D.K., Szpila M., Kiełbasa A., Brouze M., Przychodzka A., Prokurat K., Szczepańska K., Ajduk A.*

Department of Embryology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Warsaw;

*aajduk@biol.uw.edu.pl

Postovulatory aging occurs between ovulation of oocytes and their fertilization. It has been known that aged oocytes have lower developmental potential. We wished to explore how postovulatory aging affects physiology of mammalian oocytes on a molecular level.

In our experiments we used mouse oocytes and subjected them to postovulatory aging in *in vitro* or *in vivo* conditions for 9 or 25 hrs. In our analyses we applied numerous techniques of molecular and cell biology, including microarrays and qPCR, time lapse imaging and immunofluorescence staining (depending on the experiment, N ranged from 20 to 100 oocytes for each experimental group). This approach allowed us to examine a wide spectrum of potential aging effects.

We have shown that postovulatory aging significantly downregulates expression of many genes, including those involved in energy metabolism, cytoskeleton and cell cycle. This change in gene expression is reflected by the phenotype of aged oocytes and embryos obtained from those oocytes — they display lower mitochondrial activity, cytoskeletal aberrations and altered dynamics of the cell cycle. Moreover, postovulatory aging modifies pattern of Ca^{2+} oscillations triggered in the oocyte by fertilization: they tend to occur with higher frequency but have lower amplitude than those in freshly ovulated oocytes. This correlates with a decreased amount of Ca^{2+} stored in the endoplasmic reticulum. Most interestingly, postovulatory aging occurs differently in oviducts than in *in vitro* culture: *in vivo* conditions affect oocyte's physiology much more severely.

In summary, we have shown that postovulatory aging deregulates many aspects of oocyte physiology: energy metabolism, Ca^{2+} homeostasis, cytoskeleton functionality and cell cycle progression. All these alterations lead to decreased developmental potential of the resulting embryos.

The work has been financed by the Homing-plus grant (HOMING PLUS/2011–4/1) from the Foundation for Polish Science and by Sonata grant (UMO-2012/07/D/NZ5/04301) from the National Science Centre (Poland) to AA.

Ekspresja kwasu lizofosfatydowego (LPA) oraz markerów jakości oocytu w kompleksach oocyt-komórki wzgórka jajonośnego u krowy zależy od rodzaju pęcherzyka jajnikowego

Expression of lysophosphatidic acid (LPA) and oocyte quality markers in cumulus-oocyte complexes in bovine depends on the type of ovarian follicle

Sinderewicz E., Staszkievicz J.*, Grycmacher K., Boruszewska D., Kowalczyk-Zięba I., Woławek-Potocka I.

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;

*j.staszkievicz@pan.olsztyn.pl

Kwas lizofosfatydowy (LPA) jest prostym fosfolipidem zaangażowanym w procesy fizjologiczne i patologiczne w różnych typach komórek. LPA ulega ekspresji w układzie rodnym krowy, w tym w pęcherzyku jajnikowym oraz kompleksie oocyt-komórki wzgórka jajonośnego (COC). Celem badań było określenie czy ekspresja LPA oraz markerów jakości oocytu w kompleksach oocyt-komórki wzgórka jajonośnego jest zależna od typu pęcherzyka jajnikowego krowy.

Z pęcherzyków jajnikowych pobrano COCs oraz płyn pęcherzykowy. Na podstawie stosunku koncentracji $E_2:P_4$ w płynie pęcherzykowym, pęcherzyki zostały sklasyfikowane na zdrowe, przejściowe i atretyczne. W kompleksach oocyt-komórki wzgórka jajonośnego, pochodzących z trzech grup pęcherzyków, zbadano ekspresję mRNA receptorów LPA — *LPAR1-4*, enzymów uczestniczących w syntezie LPA — autotaksyny (AX) i fosfolipazy A_2 (*PLA_2*) oraz markerów jakości oocytu — białko morfogenetyczne kości 15 (*BMP15*), czynnik wzrostu i różnicowania 9 (*GDF9*), folistatyna (*FST*), katepsyny B i Z (*CTSB*, *CTSZ*) metodą Real-Time PCR z zastosowaniem sond Taq Man. Wyniki analizowano z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA.

Wykazano ekspresję mRNA receptorów LPA i enzymów zaangażowanych w syntezę LPA w COC pochodzących z wszystkich typów pęcherzyków jajnikowych (n=8). Poziom ekspresji mRNA tych receptorów i enzymów jest zależny od typu pęcherzyka jajnikowego. Najwyższą ekspresję *LPARs* odnotowano w pęcherzykach zdrowych, a najniższą w atretycznych. Spośród czterech receptorów najwyższą ekspresję wykazano dla *LPAR2*. AX charakteryzowała znacznie wyższa ekspresja w zdrowych pęcherzykach, w stosunku do *PLA_2*. Wykazano także ekspresję mRNA markerów jakości oocytu zależną od typu pęcherzyka jajnikowego. Ekspresja *GDF9* i *BMP15* była najwyższa w zdrowych pęcherzykach.

Uzyskane wyniki sugerują, że rodzaj pęcherzyka jajnikowego determinuje jakość pochodzącego z niego oocytu.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (grant 2012/05/E/NZ9/03480).

Morphokinetic analysis of preimplantation mouse embryo development by Time Lapse Monitoring (TLM) as a new animal model for experimental embryology
Analiza morfokinetyki rozwoju preimplantacyjnego zarodków myszy poprzez Monitoring Rozwoju Zarodkowego (TLM) jako nowy model zwierzęcy w embriologii eksperymentalnej

Sokołowski G.^{1,*}, Faundez R.², Niwińska A.², Sandowska-Markiewicz Z.¹, Gajewska M.¹, Świderek W.³,
 Woszczyński M.¹, Wójcik-Trechcińska U.¹, Ostrowski J.¹, Gajewski Z.²

¹*The Department of Genetics, The Maria Skłodowska — Curie Oncology Center and Institute, Warsaw;*

²*The Department of Large Animal Diseases with Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences, Center for Biomedical Research (CBB-SGGW), Warsaw;*

³*The Department of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Animal Sciences, Warsaw University of Life Science, Warsaw;*

*gsokolowski@coi.pl

The aim of the study was to evaluate the preimplantation developmental potential of mouse embryos from different strains, using Time Lapse Monitoring (TLM). The morphokinetic analysis of good quality mouse embryos can provide a new animal model in experimental embryology.

A total of 400 embryos were collected from 64 female mice, 8 per each strain (8–10 weeks old). 129/SvW, A.CA/W, AKR/W, BN/aW, C57BL/6W, C57BL/10W, C3H/W, C3H^{wad}/W female mice were superovulated, mated and euthanized, according to the standard breeding procedures. Embryos were flushed from oviducts, cultured for 120 hours in three gas atmosphere incubator. The morphokinetic assessment was performed using the Primo Vision TLMD System (Vitrolife, Sweden): 25 morphokinetic parameters were used (16 points from the 1st cleavage to the expanding blastocyst, cleavage durations, interval periods, fragmentation and degeneration). Statistical evaluation was performed using Statistica 13.1 PL.

Mouse strains have different embryo developmental potential. Timing and durations of 2nd and 3rd cleavages in relation with 1st cleavage of good quality embryos were significantly different: over 2-times shorter, and 4-times less fragmentation than bad quality embryos. The morphokinetic model of mouse embryo development was based on the medians time of cleavages from 2nd cleavage to expanding blastocyst stage in relation with 1st cleavage. It was estimated (ROC and survival analysis) optimal time intervals for reaching the second (1150–1465 min) and third (1820–2635 min) division of embryonal development. Embryos reaching a particular stage of development in the estimated time intervals optimal for embryonic development, more likely (10-times) reach the stage of expanding blastocyst than embryos outside these time intervals.

The 2nd and 3rd cleavage may serve as a prognostic factor for early evaluation of the embryo development potential.

Supported by Grant no. SN/GW02/2015 The Maria Skłodowska-Curie Oncology Center and Institute.

Influence of the oxygen level and protein components on differentiation of first cell lines in rabbit preimplantation embryos during *in vitro* culture

Wpływ poziomu tlenu i komponentów białkowych na różnicowanie się pierwszych linii komórkowych w przedimplantacyjnym zarodku królika w warunkach hodowli *in vitro*

Stachowiak A.^{1,*}, Modliński J.A.¹, Duszewska A.M.², Gręda P.², Piliszek A.¹

¹*Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec;*

²*Warsaw University of Life Sciences, Warsaw;*

*a.stachowiak@ighz.pl

Early stages of mammalian embryo development are the time of major metabolic activity which supports events such as embryonic genome activation and essential morphological changes. It is also a time when differentiation of the first cell lineages — epiblast (EPI), primitive endoderm (PrE) and trophectoderm (TE) occurs. Proper differentiation and segregation of these lines play a key role in further development. Errors in this process can result in development suppression and embryo mortality at the implantation stage. Optimal embryo growth, viability and metabolism are strongly related to culture conditions. It is considered that *in vitro* embryo culture requires conditions similar to physiological. Although rabbit preimplantation embryo culture conditions are well studied, significant differences in embryo physiology and morphology between *in vivo* and *in vitro* culture are still observed.

In our study we compared the outcomes of *in vitro* culture (1) in different oxygen levels (5% and atmospheric) and with (2) addition of different protein components (FCS, BSA, KRS) to evaluate their influence on rabbit preimplantation development. The embryos (n=30, for each group) were cultured up to expanded blastocyst stage (6 dpc) in RDH medium, and then fixed and scored for cell number and development of cell lineages by immunofluorescence and confocal microscopy.

Cell number of specific cell lineages and their proper differentiation were based on localisation of lineage-specific transcription factors such as CDX2 for TE, SOX2 for EPI, and SOX17 for PrE. Our results show that decreased levels of oxygen (5%) during *in vitro* culture result in increased cell number in the embryo, including embryonic lineages (EPI), and that *in vitro* culture in RDH media adversely affects TE lineage specification, indicated by altered and incomplete expression of CDX2 in TE cells.

In summary, *in vitro* culture conditions affect embryo development and lineage specification in rabbit embryo.

Supported by KNOW — The Leading National Research Centre, Scientific Consortium „Healthy animal- safe food”.

Apoptosis in preimplantation mouse embryos: analysis of the possible inducing factors

Apoptoza w przedimplantacyjnym zarodku myszy: analiza możliwych czynników indukujących

Winiarczyk D.*, Modliński J.A., Piliszek A.

Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec;

*d.winiarczyk@ighz.pl

Apoptosis is a process of physiological cell suicide which is genetically programmed (“intracellular death program”). During apoptosis chromatin undergoes condensation and aggregation near nuclear membrane, followed by cytoplasmic shrinkage and fragmentation of the nucleus. These events are usually preceded by DNA degradation to segments corresponding to the length of the nucleosome (180–200bp). It is assumed that every cell has the potential ability to enter the path of apoptosis. This is a naturally occurring phenomenon also in preimplantation embryos. However, our observations, supported by literature data, suggest that apoptosis in the mouse does not occur until mid-blastocyst stage (first six cell cycles). To confirm this, we investigate regulation of apoptosis initiation timing in embryonic development — specifically, whether it is related to time of fertilization, cell number, nucleo-cytoplasmic (N/C) ratio or is it stage specific?

To answer this question we performed a series of micromanipulations on 2 cell embryos (n=220; to uncouple these naturally related characteristics) creating “half” embryos, 4N and 2N/4N chimeric embryos. Morulae, early and late blastocysts were analysed for the localization of phosphorylated Histone H2AX (to detect dsDNA breaks) and cleaved caspase 3 (apoptosis executioner enzyme) by immunofluorescence on confocal microscope.

Although our manipulations resulted in developmental events such as compaction and cavitation being initiated in embryos with lower (or higher) cell number compared to control (unmanipulated embryos), apoptosis still occurred only at blastocyst stage in manipulated and control group.

Therefore, our results indicate that caspase activation and apoptosis initiation in the mouse embryo are related to the strictly defined stage of development (blastocyst) and are independent from cell number in cleaving embryos and resulting blastocyst and N/C ratio.

Supported by KRP /KNOW01/2015/01/DAWWIN grant wewnętrzny.

Ultrastructural analysis of spermiogenesis in myosin VI-deficient mice
Analiza ultrastrukturalna spermiogenezy u myszy pozbawionych miozyny VI

Zakrzewski P.^{1,*}, Rędownicz M.J.², Buss F.³, Lenartowska M.¹

¹*Nicolaus Copernicus University in Toruń, Poland;*

²*Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland;*

³*University of Cambridge, United Kingdom;*

*przezak@doktorant.umk.pl

Myosin VI (MVI) has been implicated in different cellular processes, including clathrin-mediated endocytosis, Golgi organization and secretion, basolateral targeting and sorting, cell adhesion, epithelial integrity, cell migration, and nuclear processes. Moreover, an important role for MVI in actin-based spermatid maturation was demonstrated in *Drosophila*. Given that dynamic actin structures determine the success of spermiogenesis in both invertebrate and mammals, we hypothesized that MVI may be also involved in mammalian spermatid maturation. To test this hypothesis, we examined MVI expression and localization in mouse testes (Myo6sv/J). Our studies showed that MVI was associated with the structures crucial for sperm development, such as Golgi apparatus, the acrosome, acroplaxome and manchette (Zakrzewski *et al.*, 2016, *Acta Biochim Pol*). We have also found that two MVI splice variants containing a small insert and no insert are the predominant isoforms expressed in mouse testes.

Next, we examined developing spermatids/sperm in *Snell's waltzer* mice (3 males) that lack MVI (Myo6sv/sv). Although these mice display several defects in different cell types and sv/sv males exhibit somewhat reduced fertility, no studies have been published that address the possible role of MVI in mouse spermatogenesis. Thus, we have performed ultrastructural analysis of maturing spermatids in seminiferous tubules of sv/sv mutants. Our detailed studies using electron microscopy have revealed some evident structural disruptions in developing sperm of MVI-deficient males.

This is the first evidence that the unconventional actin-based motor protein, MVI, may be involved in key events of spermiogenesis in mammals, including acrosome biogenesis, spermatid elongation and spermiation.

This project was supported by statutory funds from Ministry of Science and Higher Education (PL) for (1) Nicolaus Copernicus University in Toruń, including grants for young scientist (to PZ), and (2) the Nencki Institute.

**The influence of pluripotency state of mouse ESCs on their ability
to produce chimaeras**

**Wpływ poziomu pluripotencji macierzystych komórek zarodkowych
na ich zdolność do tworzenia chimer**

Żyzynska-Galeńska K.^{1,*}, Modliński J.A.¹, Piliszek A.¹, Savatier P.³, Bernat A.^{1,2}

¹Laboratory of Experimental Embryology, Institute of Genetics and Animal Breeding,
Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland;

²Laboratory of Molecular Diagnostics, Laboratory of Genetic Analysis, Department of Biotechnology,
Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk & Medical University of Gdansk,
Gdansk, Poland;

³INSERM U1208, Stem-Cell and Brain Research Institute, Pluripotent Stem Cells in Mammals Group
Bron/Lyon, France;

*k.zyzynska@ighz.pl

Derived from the inner cell mass (ICM) of blastocyst, embryonic stem cells (ESCs) possess unique feature of pluripotency, understood as unlimited self-renewal and capacity to generate all somatic lineages and the germline. However, depending on culture conditions of these cells, several pluripotency states can exist in cell population: ground, naive and primed. ESCs cultured in the presence of serum and LIF represent naive state of pluripotency, but in this state a high degree of heterogeneity has been shown. Recently it has been shown, that ESCs cultured in medium without serum, but inhibitors of MAPK and GSK3 pathways, can reach ground state of pluripotency, where cells are homogenous with features close to epiblast of the blastocyst (Ying *et al.*, 2008). It has been also demonstrated that STAT3 induced overexpression reinforces self-renewal of ESCs and efficiently blocks differentiation into mesoderm and endoderm (Bourillot *et al.*, 2008).

Our experiments were designed to verify the possibility that pluripotency state of ESCs may have effect on their ability to colonise the blastocyst. Mouse ESCs cultured in various conditions were injected into cleaving 8-cell embryos, under zona pellucida. In each experiment embryos were divided into three groups: 1) receiving ESCs cultured in standard conditions (LIF/FBS), 2) receiving ESCs overexpressing STAT3 and 3) where two type of cells were injected.

We are going to show that ESCs of all analysed backgrounds have affinity to ICM. Injected cells frequently occupied ICM, becoming the prospective embryo proper. In groups where two different background of ESCs were used, some competition between cells was observed. These primary results show that pluripotency state of ESCs may influence their ability to colonise ICM and then embryonic tissues. Genetic analyses are yet to be done to confirm the status of cells in each analysed blastocyst.

In conclusion, this work shows that depending on culture condition of ESCs and concomitant pluripotency level, the rate of obtained chimerism may vary. These studies will lay ground for better understanding of the dynamics of cell integration and the mechanisms of chimaera production.

Funded by KNOW (Leading National Research Centre) Scientific Consortium "Healthy Animal — Safe Food", decision of Ministry of Science and Higher Education No. 05-1/KNOW2/2015.

Proteomic analysis of sperm proteins related to the freezability of carp semen
Proteomiczna identyfikacja białek plemnikowych związanych z przydatnością do
mrożenia nasienia karpia

Dietrich M.A.^{1,*}, Irnazarow I.², Karol H.¹, Liszewska E.¹, Ciereszko A.¹

¹*Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

²*Institute of Ichthyobiology and Aquaculture, Polish Academy of Sciences, Gołysz;*

*m.dietrich@pan.olsztyn.pl

Our recent studies indicated that carp semen freezability may be related to different seminal plasma protein profiles. However, to the best of our knowledge, there is no information concerning the relationship between proteome of carp spermatozoa and freezability. The aims of the present study were to compare the proteome of spermatozoa of good (GF) and poor (PF) carp semen and to identify differentially abundant proteins. Moreover, we compared supernatant after cryopreservation of GF and PF semen and identified proteins released in the higher quantities from spermatozoa of PF semen.

Semen from carp males of GF (n=6) and PF (n=6) was centrifuged to obtain spermatozoa. Then, samples were sonicated with lysis buffer for protein extraction, centrifuged and applied to two-dimensional difference gel electrophoresis. The gels were analyzed using DeCyder software ($P < 0.05$ with FDR correction) and differential proteins were identified using mass spectrometry MALDI-TOF/TOF.

The carp semen was classified as good ($71 \pm 6\%$ motile sperm) and poor ($47 \pm 3\%$ motile sperm) freezability upon their sperm motility parameters assessed after freezing-thawing using computer assisted sperm analysis system. We identified 22 and 18 proteins enriched in spermatozoa of GF and PF, respectively. Moreover, we found that PF differed from GF regarding 12 proteins present in higher amount in supernatant after cryopreservation.

Our results indicated that good freezability is related to higher concentrations of proteins involved in maintenance of flagella structure, membrane fluidity, efficient control of Ca^{2+} and sperm motility, energy production and antioxidative protection which likely reflect full maturation status of spermatozoa of GF. On the other hand, poor freezability seems to be related to the presence of proteins identified as released in the higher quantities from cryopreserved semen of PF males. The identified proteins may serve as potential bioindicators of freezing resilience of carp semen.

Supported by the National Science Centre (2011/01/D/NZ9/00628) and the Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences.

Proteomic analysis of non-phosphorylcholine-binding and phosphorylcholine-binding proteins of canine seminal plasma

Analiza proteomiczna białek niewiążących i wiążących fosforylocholiny z plazmy nasienia psa

Mogielnicka-Brzozowska M.^{1,*}, Słowińska M.², Fraser L.¹, Wysocki P.¹, Strzeżek R.¹, Wasilewska K.¹, Kordan W.¹

¹*Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Animal Bioengineering,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

²*Department of Gamete and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research,
Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

*mmog@uwm.edu.pl

Sperm phosphorylcholine-containing lipids are implicated in the fertilization process by binding to seminal plasma (SP) proteins. In this study, proteomic analysis was used to characterize the non-phosphorylcholine-binding and phosphorylcholine-binding proteins (nPChBPs and PchBPs, respectively) of canine SP.

Ejaculates, collected from five healthy crossbred dogs (n=25), were centrifuged to separate the spermatozoa from SP. The nPChBPs and PchBPs were isolated from canine SP by affinity chromatography on immobilized p-aminophenyl phosphoryl choline agarose (Thermo Fisher Scientific). Separations were performed, according to a previously described procedure (Calvete *et al.* 1997, FEBS Lett). The nPChBPs were eluted from the bed with the equilibration buffer, whereas the PchBPs were eluted from the bed with another equilibration buffer comprising 10 mM phosphorylcholine and 10 M urea. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) was performed and the spots, identified as nPChBPs and PchBPs were analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight/time of flight mass spectrometry (MALDI TOF/TOF MS). Mass spectra were acquired in the range of 700–3500 m/z, using a MALDI-TOF autoflex speed TOF/TOF mass spectrometer equipped with a smartbeam II laser (355 nm, Bruker Daltonics).

Two-dimensional electrophoresis analysis revealed that the nPChBPs and PchBPs comprised numerous low molecular weight (LMW) polypeptides (< 10 kDa) and polypeptides with molecular masses less than 80 kDa. Using mass spectrometry, it was found that 20 spots represented by the nPChBPs comprised five protein fragments such as lactotransferrin (LTF), albumin, prostaglandin H2 D-isomerase, arginine esterase (CPSE) and lipocalin-like 1 protein isoform. In contrast, the PchBPs were represented by 7 spots, which comprised only two protein fragments, such as LTF and CPSE.

Mass spectrometry analysis reaffirmed that CPSE is a major protein of the nPChBPs and PchBPs. It can be suggested that CPSE and the other sperm-coating proteins, identified in canine SP, might have a key role in the fertilization-associated events.

Supported by UWM in Olsztyn (11.610.003–300).

Differences in the binding selectivity between 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin and its metabolite to the porcine CYP1A1 enzyme

Różnice w selektywności wiązania 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioksyny i jej metabolitu do centrum aktywnego enzymu CYP1A1 świni

Molcan T.^{1,*}, Swigonska S.², Nynca A.², Sadowska A.¹, Ruszkowska M.¹, Orlowska K.¹, Ciereszko R.E.^{1,2}

¹*Department of Animal Physiology,*

²*Laboratory of Molecular Diagnostics,*

Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury, Olsztyn;

*tomasz.molcan@uwm.edu.pl

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins are widespread by-products of human industrial activity. They accumulate in tissues of animals and humans, exerting numerous adverse effects on various systems. In living organisms, dioxins are metabolized by enzymes of the cytochrome P450 family. Since the molecular mechanisms underlying dioxin susceptibility or resistance to biodegradation are unknown, in the present study we investigated *in silico* the molecular interactions between selected dioxin and its metabolite with porcine CYP1A1 (pCYP1A1).

To meet this goal, the differences in molecular interactions between 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (DCDD) or 3-OH-2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (3-OH-DCDD) and pCYP1A1 were analyzed by molecular dynamics simulation (Gromacs 4.6.7). In addition, the binding selectivity was analyzed *via* identification of the presence of access channels leading into the active site of pCYP1A1.

It was found that the examined dioxins adopted different spatial orientations within the active site of pCYP1A1. Interactions of both analyzed compounds with the pCYP1A1 active site promoted the opening of solvent channel. However, during the simulation lasting 300 ns, DCDD and 3-OH-DCDD difference in patterns of access to the channel openness was observed (Caver 3.1.0).

Knowledge on molecular interactions between the active site of pCYP1A1 and DCDD or 3-OH-DCDD may help to elucidate the detoxification mechanism of environmental pollutants.

The current study was supported by the National Center of Science in Poland (grant 2016/21/N/NZ9/02320). This research was supported in part by PL-Grid Infrastructure.

Cryopreservation of carp semen triggers oxidation of spermatozoa proteins **Kriokonserwacja nasienia karpia powoduje utlenianie białek plemnikowych**

Mostek A.*, Słowińska M., Judycka S., Karol H., Ciereszko A., Dietrich M.A.

*Department of Gametes and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research,
Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

*a.mostek@pan.olsztyn.pl

Cryopreservation causes osmotic changes and oxidative damage that have sublethal and lethal effects on fish spermatozoa. Although, it is well established that generation of ROS during cryopreservation may result in carbonylation of total proteins in carp, it is still unknown which proteins become oxidized and what the physiological consequences of this process are. We aimed to identify specific proteins that underwent carbonylation due to cryopreservation process of carp semen.

All analyses were performed within 3 experimental groups of carp semen (n=6 in each group): fresh, fresh-diluted and cryopreserved. Sperm motility parameters were measured using Computer Assisted Sperm Analysis. Viability and percentage of ROS-positive spermatozoa were performed using Muse[®] Cell Analyzer and analyzed using one-way ANOVA and post-hoc Tukey test (GraphPad Prism). To identify and quantify the specifically carbonylated spermatozoa proteins, Western blotting, in conjunction with two-dimensional electrophoresis (2D-oxyblot) and MALDI TOF/TOF mass spectrometry was employed. Normalized spot intensities on oxyblots were compared using one-way ANOVA (SameSpots).

Cryopreservation decreased viability, percentage of sperm motility and all measured motility parameters ($P \leq 0.01$). Also, cryopreservation dramatically (11-fold) increased the number of ROS-positive cells ($P \leq 0.0001$). We identified 25 spots, corresponding to 19 proteins that showed significant increase in carbonylation level after cryopreservation.

In conclusion, our results for the first time showed that cryopreservation induces an oxidation of carp sperm proteins involved in motility, metabolism, calcium ion binding, signal transduction, chaperone, intracellular transport and cytoskeleton structure. Moreover, it was shown that cryopreservation of carp semen triggers oxidative damage of many structural and motor proteins of sperm flagella, resulting in decreased percentage of motile spermatozoa and disturbed of movement trajectory.

Supported by the National Science Centre, Poland (2016/21/B/NZ9/03620).

The effects of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the proteome of porcine granulosa cells

Wpływ 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (TCDD) na proteom komórek ziarnistych świni

Orłowska K.^{1,*}, Swigonska S.², Sadowska A.¹, Ruszkowska M.¹, Nynca A.², Molcan T.¹, Ciereszko R.E.^{1,2}

¹*Department of Animal Physiology,*

²*Laboratory of Molecular Diagnostics,*

Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury, Olsztyn;

*karina.orłowska@uwm.edu.pl

Dioxins are environmental contaminants produced by human industrial activity. Due to high level of dioxin environmental and biological stability as well as its ability to bio-accumulate, an exposure of humans and animals to dioxins is chronic and widespread. It results in broad spectrum of pathologies including reproductive disorders. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is considered to be the most toxic dioxin. Current study aimed to assess the effects of TCDD on the proteome of porcine granulosa cells (AVG-16 cell line).

The AVG-16 cells were treated with TCDD (100 nM) for 24 h and total cellular protein was isolated and purified. The proteome was examined by means of two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE; n=4), and the proteins of interest were identified by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry.

It was demonstrated that TCDD treatment affected the expression of multiple proteins. It was found that 35 proteins were differentially expressed (one-way ANOVA, $P < 0.01$, fold change ≥ 2.0) in TCDD-treated cells in comparison to control (no TCDD treatment). Twenty two proteins were up-regulated and thirteen proteins were down-regulated by TCDD. Among these proteins we identified *i.e.*, beta-actin and gamma-actin involved in movement of cell or subcellular component and membrane organization.

Identification of proteins affected by TCDD will help to better understand molecular events involved in the cell response to this highly toxic dioxin.

This study was supported by grants from the National Science Center (2012/05/B/NZ9/03333) and UWM (No. 528.0206.0806).

The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the transcriptome of porcine granulosa cells

Wpływ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny na transkryptom komórek ziarnistych jajnika świni

Sadowska A.^{1,*}, Nynca A.², Pauksztó L.³, Ruszkowska M.¹, Orlowska K.¹, Swigonska S.², Molcan T.¹, Jastrzebski J.P.³, Ciereszko R.E.^{1,2}

¹*Department of Animal Physiology,*

²*Laboratory of Molecular Diagnostics,*

³*Department of Plant Physiology, Genetics and Biotechnology,*

Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;

*agnieszka.sadowska@uwm.edu.pl

Dioxins (*e.g.*, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDD) are man-made chemicals present in the environment. Due to their high level of biological stability and ability to bio-accumulate, an exposure of living organisms to dioxins is chronic and widespread. It may result in numerous disorders, including endocrine disruption and reproductive defects. Since it is known that TCDD influences porcine ovarian function, the aim of the current study was to identify genes involved in the mechanism of TCDD action and toxicity in granulosa cells using next-generation sequencing (NGS).

Porcine granulosa cells (cell line AVG-16) were cultured in six-well plates (1×10⁶ cells/ 3 ml culture medium: DMEM with 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, 0.1 mM non-essential amino acid, 2.5 ng/ml fibroblast growth factor-basic human and antibiotics mixture [100 U penicillin, 100 µg streptomycin and 0.25 µg amphotericin B/ml]). After reaching 60–65% confluency, the cells were treated with TCDD (100 nM) for 24 h (n=2). Afterwards, total cellular RNA was isolated and designated for NGS.

In TCDD-treated cells, we identified 57 (31 up- and 26 down-regulated) differentially expressed genes (P<0.05 and fold change ≥2.0; statistical tests: edgeR, limma and DESeq). A functional classification of genes which expression was significantly affected (P<0.05) by TCDD was performed using KEGG database. Since granulosa cells are important for follicular growth, development and functions, we focused on genes associated with the TGF-β signaling pathway, chemokine signaling pathway and MAPK signaling pathway. It was found that after 24 hours of treatment TCDD influenced many genes related to follicular atresia (*e.g.*, *FOXO3*, *MXI1*, *IGFBP-5*, *VEGFC*, and *THBS-1*).

Based on the analysis of the porcine granulosa cell line transcriptome it seems likely that TCDD can affect ovarian follicle fate by influencing granulosa cell proliferation and cell cycle progression. The presented results support the notion that TCDD may affect the occurrence of atresia in porcine follicles.

Supported by grants from National Science Center (2012/05/B/NZ9/03333, 2015/19/N/NZ9/00680) and UWM (528.0206.0806).

The changes in the proteome profile of porcine granulosa cell line (AVG-16) during culture time

Zmiany w profilu proteomicznym komórek ziarnistych świni (linia AVG-16) w czasie trwania hodowli

Swigonska S.^{1,*}, Orlowska K.², Kunicka Z.², Sadowska A.², Ruszkowska M.², Nynca A.¹, Molcan T.², Ciereszko R.E.^{1,2}

¹Laboratory of Molecular Diagnostics,

²Department of Animal Physiology,

Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;

*sylwia.swigonska@uwm.edu.pl

Granulosa cells, which provide a suitable environment for the growth and maturation of the oocyte and participate in the production of steroid hormones are frequently used in physiological and toxicological studies. Although AVG-16 cell line is the only porcine granulosa cell line commercially available, proteomic characterization of these cells was not carried out yet. The aim of the study was to examine changes in the proteomic profile of porcine granulosa cells during the time course of the cell culture.

The AVG-16 cells were cultured (7×10^6 cells/ 30 ml of medium) for 3, 12 or 24 h. Total soluble protein was isolated from cells with SBO4 lysis buffer. Protein extracts were purified with ReadyPrep Cleanup Kit. Proteins were separated by isoelectric focusing, equilibrated and separated in second dimension (SDS-PAGE, $n=3$). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 and analyzed with 2-D Image Master Platinum 7.0. Spots representing up- or down-regulated proteins (one way ANOVA; ≥ 2 fold change, $P < 0.01$; in comparison to 0 h — the beginning of the culture) were designated for mass spectrometry identification. The peptide mixtures were analyzed with MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. For every gel spot, its peptide mass fingerprint was obtained. Additionally, parental ions have been fragmented to increase reliability of the search. Acquired spectra were submitted to mascot engine and searched against the NCBI database for mammals.

After 3, 12 and 24 hours of culture, we identified 52 (23 up- and 29 down-regulated), 47 (25 up- and 22 down-regulated) and 57 (27 up- and 30 down-regulated) differentially expressed proteins, respectively ($P < 0.01$ and fold change ≥ 2.0) *i.e.*, annexin 5, zinc finger protein 709, lactate dehydrogenase, sphingomyelin phosphodiesterase, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein and others.

These results revealed that numerous changes occurred in the AVG-16 proteome during the culture time. This knowledge is crucial for accurate interpretation of the obtained data, since observed changes may affect cellular response to examined stimuli.

This study was supported by the National Science Center (2012/05/B/NZ9/03333) and UWM (528.0206.0806).

Effects of fibroblast growth factor 2 (FGF2) on genes expression related to steroidogenesis and angiogenesis and its interactions with prostaglandin F2 α (PGF) in the bovine corpus luteum (CL) depend on the stage of estrous cycle

Wpływ czynnika wzrostu fibroblastów 2 (FGF2) w interakcji z prostaglandyną F2 α (PGF) na ekspresję genów zaangażowanych w procesy steroidogenezy i angiogenezy w ciałku żółtym (CL) krowy zależy od fazy cyklu jajnikowego

Jończyk A.W., Piotrowska-Tomala K.K., Łukasik K., Skarżyński D.J.*

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*d.skarzynski@pan.olsztyn.pl

The aims of the study were (1) to examine the effects of fibroblast growth factor 2 (FGF2) and prostaglandin F2 α (PGF) on genes expression related to steroidogenesis and angiogenesis at early (PGF-resistant) and mid (PGF-responsive) luteal stage of the estrous cycle, and (2) to investigate auto-, paracrine and inter-cellular interactions of PGF and FGF2 in cows.

Both, luteal steroidogenic cells (LSC) and corpus luteum (CL) explants were obtained from the early and mid-luteal phases (n=6/per group), and cultured for 24 h either with FGF2 (10 ng/ml) or FGFR inhibitor (PD173074, 100 ng/ml) alone or with PGF (10⁻⁷M). The mRNA relative abundance was evaluated by qRT-PCR. Data were analyzed using parametric one-way ANOVA followed by Bonferroni comparison test (GraphPad Software). P<0.05 was considered significant.

FGF2 alone or with PGF up-regulated *VEGF* expression in LSC at both stages (P<0.05). PD173074 increased *StAR* expression at early-luteal phase (P<0.01), while combination of FGF2 and PGF or PGF alone down-regulated *StAR* expression at mid-luteal phase (P<0.01). Similarly, *3 β -HSD* and *P450_{scc}* expressions were up-regulated by PD173074 at early-luteal phase, whereas combination of FGF2 and PGF decreased their expression at mid-luteal phase (P<0.05). Moreover, combination of PD173074 and PGF significantly increased *3 β -HSD* expression at early luteal phase (P<0.001). PGF increased *VEGF* expression in early CL (P<0.05). FGF2 or PD173074 alone or with PGF and PGF alone significantly decreased *VEGF* expression in mid CL (P<0.001). *StAR* and *3 β -HSD* expressions were increased by combination of PD173074 and PGF or PGF alone in early CL (P<0.05), while PGF decreased their expressions in mid CL (P<0.05). Additionally, PD173074 and combination of PD173074 and PGF down-regulated *3 β -HSD* expression (P<0.05), while combination of FGF2 and PGF increased its expression in mid CL (P<0.001).

Genes expression profiling reveal stage-specific response to FGF2 and PGF suggested that FGF2 could regulate secretory function of LSC and its action may depend on the interaction between LSC and other accessory cells in bovine CL.

Supported NSC 2011/03/B/NZ9/01634.

Effect of gonadotropin and steroid hormones on expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in porcine ovarian follicles; *in vitro* study

Wpływ gonadotropin i hormonów steroidowych na ekspresję receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów (PPAR) w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni; badania *in vitro*

Kurowska P., Rak A.*

Department of Physiology and Toxicology of Reproduction, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University in Krakow, Krakow;

*agnieszka.rak@uj.edu.pl

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes (α , β/δ and γ) have distinct tissue localization patterns and physiological activities. The PPAR family integrates energy control with lipid and glucose metabolism and affects insulin sensitivity. Several studies have indicated the important role of PPAR γ in ovarian functions such as the cell cycle, apoptosis, and steroidogenesis. All PPAR isoforms are expressed in the ovary. Our previously study documented expression of PPARs in the porcine ovarian follicles; however, there is little data on PPARs ovarian regulators.

The aim of the present study was to investigate *in vitro* effect of gonadotropins and steroid hormones on PPARs mRNA and protein expression in the ovary. Medium follicles (4–6 mm; MFs) at 10–12 of the estrous cycle were obtained from mature (7–8 months of age) crossbred gilts (Large White and Polish Landrace) at a local abattoir. Ovarian follicles were exposed to gonadotropins: FSH and LH at 50, 100, and 150 ng/ml, and the steroids: P4, T and E2 at 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M, respectively, for 24 h. Then, mRNA and protein expression of PPAR $\alpha/\gamma/\beta$ *via* real time PCR and Western blot, respectively, were measured. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5 software, and the data were analyzed using one-way ANOVA test, followed by Tukey's honestly significant difference test.

We demonstrated that FSH significantly increased mRNA expression of PPARs isoform ($P < 0.01$), while LH only subtypes α , and γ ($P < 0.01$). Both P4 and E2 increased mRNA expression of PPAR α and γ ($P < 0.05$), without effect on β . T at all doses had no effect on mRNA expression of PPAR $\alpha/\gamma/\beta$. These results were confirmed in protein expression.

In the present preliminary study we showed regulators of ovarian PPAR $\alpha/\gamma/\beta$ expression; however, further studies are needed to check molecular mechanism of this regulation.

Supported by DS/K/ZDS/006310.

Analiza proteomu ciała żółtego podczas luteolizy i wczesnej ciąży u świni
Proteomics analysis of the pig corpus luteum during luteolysis and early pregnancy

Likszo P.*, Jalali B.M., Skarżyński D.J.

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie;

*p.likszo@pan.olsztyn.pl

Ciało żółte (CL) jest narządem endokrynnym, który charakteryzuje się gwałtownym wzrostem i krótkim czasem trwania, podczas którego dochodzi do wielu zmian w jego strukturze. Podstawową funkcją CL jest produkcja progesteronu, niezbędnego do przetrwania i rozwoju zarodka we wczesnych etapach ciąży. Większość informacji o procesach różnicowania się CL pozyskuje się w oparciu o badania genomiczne, niewiele zaś wiadomo o zmianach na poziomie proteomu. Celem badania było porównanie profilu białkowego ciała żółtego świni w trakcie luteolizy i podczas wczesnej ciąży.

W doświadczeniu porównano CL pozyskane od synchronizowanych świń będących w 15. dniu cyklu rujowego oraz w 15. dniu ciąży (wczesna ciąża; n=4/grupa). Białka uzyskanych lizatów tkanki lutealnej zostały rozdzielone w wykorzystaniem izoelektrycznego ogniskowania w zakresie pH 4–7, a w drugim etapie zastosowano dwuwymiarową elektroforezę żelową (2DE). Następnie, białka o zróżnicowanej ekspresji poddano analizie statystycznej przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ($P < 0,05$, krotność zmian 1.8) i zidentyfikowano za pomocą tandemowego spektrometru mas (MALDI-TOF/TOF).

Porównanie proteomu CL między 15. dniem cyklu rujowego i 15. dniem ciąży wykazało różnicę w poziomie ekspresji 38 białek. W 15. dniu ciąży stwierdzono zmniejszenie ekspresji białek regulatorowych aktywności CAP-G oraz białka fibrynogen beta. Natomiast zwiększoną ekspresję wykazano w przypadku białek inhibitorów proteaz serynowych, enzymów takich jak S-transferaza glutationowa, reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A, dehydrogenaza 3β -hydroksysteroidowa/delta 5-->4- izomeraza, hormon prorolaksyna oraz czynników uczestniczących w procesie translacji: eukariotyczny czynnik inicjacji translacji i eukariotyczny czynnik elongacyjny.

Podsumowując otrzymane wyniki można stwierdzić, iż zmiany zachodzące w proteomie CL związane są z procesami metabolicznymi, apoptozą, zmniejszeniem ekspresji inhibitorów proteaz czy enzymami odpowiedzialnymi za przebieg ciąży.

Źródło finansowania: dotacja statutowa IRZBŻ PAN w Olsztynie.

Wpływ chronicznego degeneracyjnego zwyrodnienia błony śluzowej macicy na funkcje wydzielnicze i profil ekspresji genów w ciałku żółtym (CL) kłaczy
Chronic degenerative endometritis changes secretory functions and mRNA transcription in equine corpus luteum (CL)

Łukasik K., Skarżyński D.J.*

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie;

*d.skarzynski@pan.olsztyn.pl

Chroniczne degeneracyjne zwyrodnienie błony śluzowej macicy (*endometrosis*) jest powiązane ze znacznym spadkiem płodności i wczesną zamieralnością zarodków u kłaczy. Wykazano, iż w przebiegu *endometrosis* dochodzi do szeregu zmian strukturalnych i funkcjonalnych, w tym zaburzenia wydzielania prostaglandyn (PG) i kwasu lizofosfatydowego (LPA) w błonie śluzowej macicy kłaczy. Można przypuszczać, że zaburzenia funkcji wydzielniczych śluzówki macicy w przebiegu *endometrosis* mogą wpływać na funkcjonowanie ciała żółtego (CL). Celem pracy było określenie stężenia progesteronu (P4) oraz profilu ekspresji enzymów biorących udział w steroidogenezie, syntezie PG, receptorów PG i LPA na poziomie mRNA w CL kłaczy w przebiegu *endometrosis*.

Ciała żółte pochodzące z wczesnej (E-CL), środkowej (M-CL) i późnej (L-CL) fazy lutealnej cyklu (n=6) pobierano poubojowo. We fragmentach błony śluzowej macicy określono stopień zwłóknienia wg. Kenney i Doig (I, IIA, IIB, III). Stężenie P4 w CL mierzone było metodą EIA, a ekspresja genów na poziomie mRNA metodą qPCR. Uzyskane wyniki w poszczególnych etapach włóknienia (kat IIA, IIB i III) porównano do kategorii I (endometrium prawidłowe).

Stężenie P4 było wyższe w E-CL w kat. IIA i w M-CL w III kat (P<0,05). Ekspresja *P450scc* i *3βHSD* na poziomie mRNA w E-CL była niższa w kategoriach IIA, IIB i III, z kolei w M-CL była wyższa w przypadku *3βHSD* i *StAR* w kategorii IIB (P<0,05). W kat. IIA wykazano wzrost ekspresji *LPAR5*, *PGER2*, *PGFR*, *PTGS-2* i *PGES* w E-CL, natomiast spadek obserwowany był w kat. IIB i III dla *LPAR1*, *LPAR2*, *LPAR6*, *PGER3*, *PGER4* i *PGFS* (P<0,05). Ekspresja badanych genów była wyższa w M-CL w przebiegu *endometrosis*, jedynie *LPAR6* i *PGER4* była niższa (P<0,05). W L-CL zaobserwowano spadek ekspresji *PGER2*, *PGER4*, *PGFR* i *PGES* w przebiegu *endometrosis* (P<0,05).

Podczas *endometrosis* dochodzi do zaburzeń funkcji wydzielniczych CL, głównie poprzez zmiany w steroidogenezie oraz w wydzielaniu i działaniu PG i LPA.

Finansowano z grantu NCN2011/02/A/NZ5/00338.

Influence of injection administration of royal jelly during estrus synchronization with fluorogestone acetate on ovarian function and reproductive performance of ewes

Wpływ iniekcyjnego podawania mlecza pszczelego w okresie synchronizacji rui octanem fluorogestonu na funkcje jajników i wskaźniki użytkowości rozplodowej owiec

Murawski M.¹, Patkowski K.³, Schwarz T.^{2,*}, Szymanowska A.³, Grygier J.¹, Gruszecki T.³,
Greguła-Kania M.³, Borsuk G.⁴, Olszewski K.⁴, Bartlewski P.M.⁵

¹*Department of Animal Biotechnology, Agricultural University of Krakow, Cracow, Poland;*

²*Institute of Animal Sciences, Agricultural University of Krakow, Cracow, Poland;*

³*Department of Small Ruminants Breeding and Agricultural Advisory,
University of Life Science in Lublin, Lublin, Poland;*

⁴*Labolatory of Environmental Biology and Apidologie, University of Life Science in Lublin, Lublin, Poland;*

⁵*Department of Biomedical Sciences, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada;*

*rzschar@cyf-kr.edu.pl

Royal jelly (RJ) has been used to boost fertility in several mammalian species. The general purpose of this study was to examine the influence of RJ on ovarian activity and reproductive parameters in cyclic ewes (February).

Three groups of Polish Lowland ewes (n=15 each) were used in the present experiment. The time of estrus was synchronized in all animals with intravaginal sponges soaked with 40 mg of fluorogestone acetate (Chronogest®; MSD Animal Health, Boxmeer, Holland) that were left in place for 14 days. On the day of sponge withdrawal, Group F ewes received 400 IU of Folligon® i.m. (Intervet Int., Warsaw, Poland) whereas Group R sheep received the first of 14 daily injections of 500 mg of RJ (s.c.); Group C served as controls. Estrus was detected with a teaser ram every 12 h from the time of sponge removal. The ewes were inseminated laparoscopically 18 h after estrus detection. Daily transrectal ultrasonography of ovaries was performed from 7 days after sponge insertion until ovulation to monitor dynamic changes in morphology of intraovarian structures. The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's test.

The onset of behavioral estrus occurred 53.6±11.0^A, 38.4±6.7^B and 57.4±15.0^A h (mean±SD) after the end of Chronogest® treatment in Groups R, F and C, respectively (P<0.01). The percentage of pregnant ewes tended to be greater in Group F (93.3%) compared with Groups R and C (both 66.7%). The mean number of live-born lambs was 1.7±0.5^{ab}, 1.9±0.5^a and 1.3±0.5^b in Groups R, F and C, respectively (P<0.05). Maximum diameter (6.07±0.93, 6.07±0.80 and 5.71±0.53 mm) and mean growth rates (1.02±0.28, 0.95±0.19 and 0.98±0.30 mm/day; Groups R, F and C, respectively) of ovulating ovarian follicles did not vary (P>0.05) between the three subsets of ewes studied.

It can be concluded that daily administration of RJ throughout the period of priming with progestogen-containing sponges appeared to exert beneficial effects on lamb productivity without significantly altering antral follicular kinetics in cyclic ewes.

Supported by project funds of BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

**The involvement of hypoxia and HIF1A in molecular processes
determining luteal function maintenance in pigs**
**Udział hipoksji i HIF1A w procesach warunkujących utrzymanie
funkcji lutealnej u świni**

Przygodzka E.*, Myszczyński K., Zięcik A.J.

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*e.bolzan@pan.olsztyn.pl

Considering, the involvement of hypoxia and hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in the corpus luteum (CL) formation and its regression in the cow, we hypothesized that they are also important regulators of molecular processes occurring in the porcine CL.

To verify hypothesis CL obtained from gilts on day 13 of the estrous cycle and pregnancy (n=5 per reproductive status) were cut into luteal slices and incubated in various O₂ concentration (20%, 10% and 3% of O₂) in the presence of HIF1A activator (CoCl₂) or its inhibitor (KCF72). After incubation, slices and medium were collected. qPCR was applied in order to determine the level of *HIF1A*, *VEGFA* and *STAR* in luteal tissue. The concentration of progesterone (P₄) in medium was measured using RIA. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA tests. Additionally, *in silico* analysis using FIMO motif search tool and custom Python script was performed to identify genes potentially regulated by HIF-1 in the porcine genome.

Decreased O₂ supply gradually inhibited (P<0.05) P₄ production by luteal tissue of cyclic and pregnant pigs, while increased (P<0.05) *HIF1A*, *STAR* and *VEGFA* expression only in CL of cyclic gilts. Incubation of luteal tissue in all of applied O₂ conditions and CoCl₂ presence stimulated (P<0.05) *HIF1A*, *VEGFA* and *STAR* mRNA expression in comparison to the control and KCF72 treated tissues. Interestingly, P₄ concentration increased (P<0.05) in medium after incubation of luteal tissue from cyclic pigs with CoCl₂ in 3% of O₂. Although, P₄ production by luteal tissue of pregnant animals was enhanced (P<0.05) after CoCl₂ treatment in 20% and 10% of O₂, there was no changes in the expression of examined genes. *In silico* analysis of transcription factor binding sites in genes promoters revealed *VEGFA*, *STAR* as well as other genes associated with luteal function maintenance (e.g., *PGR*, *PGRMC1*, *EDN1*, *EDNRA*) among potential targets of HIF-1.

Hypoxia and HIF1 can evoke molecular changes supporting CL maintenance during the late luteal phase of the estrous cycle.

Funded by National Science Centre grant 2014/13/N/NZ9/01062.

The effect of prostaglandin E₂ on molecular changes occurring in the porcine corpus luteum during early pregnancy

Wpływ prostaglandyny E₂ na zmiany molekularne zachodzące w ciałku żółtym świni podczas wczesnej ciąży

Przygodzka E.*, Waławik A., Zięcik A.J.

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*e.bolzan@pan.olsztyn.pl

Prostaglandin E₂ (PGE₂) is one of conceptus signals in the pig; however, the effect of this prostanoid on molecular changes occurring in the porcine corpus luteum (CL) during early pregnancy remains almost unknown. The aim of the present study was to examine: (1) content of phosphorylated forms of protein kinase A (PKA) and PKB in the porcine CL of cyclic and pregnant pigs; (2) effect of PGE₂ *in vitro* on phosphorylation of PKA and PKB as well as on content of proteins involved in progesterone and estradiol production (STAR and CYP19A1, respectively) and angiogenesis (VEGFA) in luteal tissue slices.

Above mentioned aims were realized by using porcine CL collected from gilts on day 14 of the estrous cycle and the corresponding day of pregnancy (n=5–6 per group). Additionally, CLs from pregnant gilts were cut into slices and incubated in the presence of PGE₂ and appropriate antagonist of its receptor (PTGER2 or PTGER4). Protein content was determined using Western blot, while t-Student test and one-way ANOVA were applied to analyze obtained results.

Western blot analysis showed higher (P<0.05) content of P-PKA (Thr198), P-CREB (Ser133) and P-PKB (Ser473) in the porcine CL on day 14 of pregnancy in comparison to the corresponding day of the estrous cycle. The enhanced (P<0.05) phosphorylation of all above mentioned proteins was observed in luteal tissue slices collected from early pregnant pigs and treated with PGE₂ (1 μM) in comparison to control. Moreover, PGE₂ enhanced (P<0.005) content of STAR, CYP19A1 and VEGFA in luteal tissue slices incubated in the presence of appropriate antagonist of PGE₂ receptors.

Obtained results suggest that binding of PGE₂ to PTGER2 and/or PTGER4 activates PKA and PKB signaling pathways. Finally, it enhances the expression of proteins involved in crucial processes determining luteal function maintenance during early pregnancy in pigs.

Funded by statutory funds IARFR PAS in Olsztyn.

**Częściowa metylacja promotorów izoform PGRA i PGRB receptora progesteronu
w układzie rozrodczym krowy**

**Partial methylation of progesterone receptor isoform A and B promoters
in the reproductive system of cows**

Rekawiecki R.*, Kowalik M.K., Kisielevska K., Kotwica J.

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polska Akademia Nauk, Olsztyn;

*r.rekawiecki@pan.olsztyn.pl

Progesteron (P4) działa na komórki docelowe przez jądrowy receptor (PGR) występujący w postaci dwóch izoform: A (PGRA) i B (PGRB). PGRB jest silnym aktywatorem genów zależnych od P4 w komórkach docelowych, natomiast PGRA jest słabym aktywatorem takich genów. W przypadku, gdy obie izoformy ulegają aktywacji w komórce, PGRA działa jako inhibitor PGRB osłabiając oddziaływanie P4 z receptorem. Możliwe zatem że metylacja promotorów PGRA i PGRB może być procesem regulującym ich ekspresję, a przez to także regulować działanie P4 w CL i endometrium. Dlatego też, celem tej pracy było sprawdzenie czy (a) promotory obu izoform receptora mogą ulegać metylacji, (b) określenie procentowej zawartości metylacji promotora każdej z izoform.

Do badań użyto skrawków ciałek żółtych (CL) i endometrium od krów w dniach 2.-5., 6.-10., 11.-16. i 17.-20. cyklu rujowego. Wyizolowany genomowy DNA konwertowano wodorosiarczynem sodu i amplifikowano z użyciem metylo-specyficznego PCR ze starterami wykrywającymi sekwencje metylowane i niemetylowane. Określenie procentowej zawartości metylacji przeprowadzono stosując reakcję z enzymami restrykcyjnymi HpaII i MspI, a następnie reakcję real-time PCR. Enzymy te działają z różną intensywnością w zależności od stopnia metylacji danego odcinka DNA. Wyniki porównano z użyciem jednoczynnikowej analizy ANOVA i testu Bonferroni.

Elektroforeza w żelu agarozowym produktów metylo-specyficznego PCR wykazała częściową metylację promotorów PGRA i PGRB w CL i endometrium podczas cyklu rujowego. Procentowa zawartość metylacji promotora PGRA była wyższa w CL (2,5–3 razy; $P < 0,001$ – $0,0001$) oraz w endometrium (0,7–2,5 razy; $P < 0,05$ – $0,01$) w trakcie cyklu rujowego w porównaniu do metylacji promotora PGRB. Natomiast, całkowity poziom metylacji obu izoform w CL był około 2-krotnie wyższy niż w endometrium.

Uzyskane dane sugerują, że wyższa metylacja promotora izoformy PGRA może być mechanizmem regulującym aktywność inhibicyjną PGRA w stosunku do PGRB i w ten sposób wpływać na regulację działania P4 w CL, jak i w endometrium.

Finansowano częściowo ze środków grantu NCN nr UMO-2015/17/B/NZ4/02440 oraz środków statutowych IRZiBŻ PAN w Olsztynie.

Expression of apelin and apelin receptor (APJ) in porcine corpus luteum cells and effect of apelin on progesterone secretion

Ekspresja apeliny i jej receptora (APJ) w komórkach ciała żółtego świni oraz określenie roli apeliny w regulacji sekrecji progesteronu

Różycka M.¹, Grzesiak M.², Kurowska P.¹, Rame C.³, Dupont J.³, Rak A.^{1*}

¹Department of Physiology and Toxicology of Reproduction, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University in Krakow, Krakow, Poland;

²Department of Animal Physiology and Endocrinology, University of Agriculture in Krakow, Krakow, Poland;

³INRA, Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France;

*agnieszka.rak@uj.edu.pl

Apelin, an endogenous ligand of the G protein coupled receptor APJ is one of the new described adipokines secreted by mature adipocytes in human. Last data have been reported that apelin can regulate ovarian follicles function, such as steroid secretion and cell survival in bovine and rats species.

The aim of the present study was to investigate the expression (mRNA and protein) and immunolocalization of apelin and APJ (*via* real time PCR, Western blot and immunohistochemistry, respectively) in porcine corpora lutea (CL) collected during early (CL1: 1–2 days after ovulation), middle (CL2: 7–10 after ovulation), and late luteal phase (CL3: 13–15 after ovulation). Direct *in vitro* effects of apelin on progesterone (P4) secretion and 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) activity, which were measured by the conversion of pregnenolone (P5) to P4, and 3β-HSD protein expression were analyzed. CL2 cells were first cultured for 48 h with apelin (0.02–20 ng/ml) with P5 (5 µg/ml) or without and then levels of P4 was determined by ELISA, and 3β-HSD protein expression was assessed by Western blot. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5 software, and the data were analyzed using one-way ANOVA test, followed by Tukey's honestly significant difference test.

We demonstrated increased apelin and APJ expression in CL development, with maximal levels in CL2 (P<0.05). Apelin staining was found in the cytoplasm of luteal cells in all examined stages of the CL development, while APJ was observed only in CL2–3 and displayed membranous localization within luteal cells. Apelin significantly increased *in vitro* P4 secretion (P<0.001) by 3β-HSD activity (P<0.01) and protein expression (P<0.01).

The presence of apelin/APJ in porcine corpora lutea and the direct stimulatory effects of apelin on luteal P4 secretion *via* 3β-HSD suggest potential auto/paracrine luteotropic action of apelin in the porcine ovary.

Supported by DSC/MND/WBiNoZ/IZ/5/2014 and Polish — French bilater project MNiSW "POLONIUM" (2016–2017).

**Effect of nitrophenols on steroidogenesis in prehierarchical ovarian follicles
of the hen (*Gallus domesticus*)**

**Wpływ nitrofenoli na steroidogenezę w prehierarchicznych pęcherzykach jajnikowych
kury (*Gallus domesticus*)**

Sechman A.*, Grzegorzewska A.K., Grzesiak M., Karpeta A., Katarzyńska-Banasik D., Kowalik K.,
Hrabia A.

Department of Animal Physiology & Endocrinology, University of Agriculture in Krakow, Krakow;

*rzsechma@cyf-kr.edu.pl

Nitrophenols, the common environmental pollutants, have serious effects on animal and human health *via* endocrine disruption. To assess influence of these compounds on female reproduction the chicken ovary was used as a model.

In order to examine *in vitro* effects of two selected nitrophenols, *i.e.*, 4-nitrophenol (PNP) and 3-methyl-4-nitrophenol (PNMC) on the ovarian steroidogenesis, white (WF; 1–4 mm) and yellowish (YF; 4–8 mm) prehierarchical follicles were isolated 2 h after ovulation from the chicken ovary. In the first experiment, the intact WF and YF follicles were incubated for 24 h in medium supplemented with increasing doses of PNP or PNMC (10^{-8} – 10^{-4} M; n=6). Subsequently, testosterone (T) and estradiol (E2) concentrations in collected media were determined by RIA method. In the second experiment, these follicles were incubated for 6 h in medium supplemented with PNP or PNMC (10^{-6} M; n=6) and mRNA expression of *STAR*, *HSD3B* and *CYP19A1* genes in the wall of the WF and YF follicles was measured by real-time qPCR. The data were statistically analyzed by two-way analysis of variance followed by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Both nitrophenols significantly decreased T and E2 secretion by the WF and YF follicles; the highest effects were found at the dose of 10^{-8} M ($P<0.01$). PNP and PNMC significantly reduced mRNA expression of all investigated steroidogenic genes ($P<0.05$ – 0.01) in the WF follicles; however, they did not affect their expression in the YF follicles.

In conclusion, the present study suggests that PNP and PNMC have disruptive effects on steroidogenesis process in the prehierarchical follicles of the hen ovary. The inhibitory action of these xenobiotics can be, at least partly, explained by reduction of transcription of steroidogenic genes in the theca layer of these follicles, resulting in decrease of steroid hormone synthesis and secretion.

Supported by grant of National Science Centre, Poland: UMO-2014/15/B/NZ9/01986.

Kwas lizofosfatydowy (LPA) moduluje funkcje bańki jajowodu w okołoowulacyjnej oraz wczesnolutealnej fazie cyklu rujowego u krowy

Lysophosphatidic acid (LPA) modulates ampulla functions of bovine oviduct in follicular and early-luteal phases of estrous cycle

Sinderewicz E.*, Boruszewska D., Grycmacher K., Kowalczyk-Zięba I., Staszkievicz J., Wocławek-Potocka I.

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie;

*e.sinderewicz@pan.olsztyn.pl

Kwas lizofosfatydowy (LPA) jest czynnikiem regulującym procesy rozrodcze u krowy. Dowiedziono roli LPA w regulacji sekrecji prostaglandyn w macicy krowy, dojrzewania oocyty, zapłodnienia oraz wczesnego rozwoju zarodkowego. LPA jest także celem działania i miejscem syntezy w jajowodzie krowy, jednakże jego rola w tym organie nie została dotychczas zbadana. Celem badań było określenie wpływu LPA na produkcję PGE2 i PGF2 α oraz ekspresję czynników zaangażowanych w interakcje pomiędzy oocytem lub zarodkiem a jajowodem krowy, w jajowodzie krowy w różnych fazach cyklu jajnikowego.

Hodowlę tkankową bańki i cieśni jajowodu w fazach okołoowulacyjnej i wczesnolutealnej cyklu rujowego prowadzono przez 12 i 24 godz. w obecności LPA (10^{-9} M) lub PBS (kontrola). Koncentrację PGE2 i PGF2 α w medium hodowlanym oznaczono metodą EIA. W tkankach zbadano ekspresję *OVGP1*, *ISG15*, *LIF*, *LIFR*, *OAS1* metodą Real Time PCR. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA.

Uzyskane wyniki dowodzą, że LPA stymuluje syntezę PGF2 α w bańce jajowodu we wczesnolutealnej fazie cyklu rujowego oraz hamuje jej produkcję w fazie okołoowulacyjnej. Nie stwierdzono wpływu LPA na syntezę PGF2 α w cieśni jajowodu. Nie stwierdzono wpływu LPA na syntezę PGE2 w jajowodzie krowy. Ponadto, wykazano, że LPA stymuluje ekspresję *OAS1*, *LIFR*, *ISG15*, *OVGP1* oraz hamuje ekspresję *LIF* w bańce jajowodu we wczesnolutealnej fazie cyklu jajnikowego. W cieśni jajowodu wykazano dodatni wpływ LPA na ekspresję *OVGP1*.

Podsumowując, LPA w bańce jajowodu krowy, moduluje sekrecję PGF2 α w okołoowulacyjnej oraz wczesnolutealnej fazie cyklu jajnikowego oraz ekspresję czynników zaangażowanych w interakcję pomiędzy oocytem a jajowodem krowy tuż po owulacji. Mając na uwadze wpływ PGF2 α na kurczliwość jajowodu oraz znaczącą rolę LIF i *OVGP1* w dojrzewaniu oocyty oraz zapłodnieniu, a także udział LPA w modulacji ekspresji ww. czynników, sugerujemy wpływ LPA na regulację czynności jajowodu u krowy.

Badania finansowane ze środków NCN: 2013/11/N/NZ9/00101.

Characterization and differentiation of porcine ovarian putative stem cells into neuronal-like cells

Charakterystyka i różnicowanie domniemanych komórek macierzystych jajnika świni w komórki podobne do neuronów

Wartalski K.*, Gorczyca G., Duda M.

*Department of Endocrinology, Institute of Zoology and Biomedical Research,
Jagiellonian University in Krakow;*

*kamil.wartalski@doctoral.uj.edu.pl

Population of putative stem cells (PSCs) in the ovary is characterized by the expression of some markers of stem cells. The aim of this work was isolation and characterization of ovarian PSCs.

To isolate ovarian PSCs, antibodies against SSEA-4 and CD34 conjugated to magnetic beads were used. Isolation was carried out according to the modified protocol recommended by the manufacturer. Isolated cells were cultured *in vitro* for 7 days (control cultures) in DMEM/F12 medium with the additions of stem cells factor (SCF) and special supplement B-27 (serum substitute). In experimental cultures PSCs were differentiated for 7 days using forskolin or forskolin with bFGF at different concentrations. Total protein and mRNA were isolated for future molecular analysis, moreover immunofluorescence studies of stem and neuronal cells markers were performed.

In the PSC cell cultures after 48 h characteristic embryoid bodies were observed. The immunostaining for c-Kit, GDF-9, Oct-3/4, Sox-2 and Ki-67 were mainly detected in the cytoplasm of PSCs cultured for 7 days. The expression of mRNA for *c-Kit*, *GDF-9* and *Ki-67* in PSCs was revealed using the reverse transcriptase PCR technique. Western blot analysis were conducted in all samples for stem cell markers such as Oct-3/4, Sox-2, c-Kit, and proliferation marker such as Ki-67. After PSCs culture under forskolin or forskolin with bFGF influence, neuronal-like processes was observed. Interestingly, cytotoxic effect of higher concentrations of forskolin was noticed. In the part of PSCs after differentiation nuclear and cytoplasmic immunolocalization of nestin has been demonstrated.

The obtained results allow to presume that stem cells are actually present in the porcine ovary. Cells most likely exhibit multipotent and pluripotent ability to differentiation. Morphology of cells stimulated by differentiation factors and detection of nestin shows that ovarian PSCs may differentiate into cells similar to neurons. The best result of differentiation was obtained using forskolin and bFGF together.

Funded from the National Science Center Poland, project No: DEC-2016/21/N/NZ9/01205.

Leptin signaling activation mediates ovarian pathology in diet-induced obesity mice
Wpływ wzmożonej aktywacji leptyny na powstawanie zmian patologicznych w jajniku
myszy z otyłością indukowaną dietą

Wołodko K., Adamowski M., Skarżyński D.J., Galvao A.M.*

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*a.galvao@pan.olsztyn.pl

Obesity is associated with infertility. We have previously verified that leptin signaling is impaired in the ovaries of mice subjected to diet-induced obesity (DIO). In the present work, we correlate the activation of leptin (LEP) signaling in the ovary and the expression of its inhibitors Protein-tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and Suppressor of Cytokine Signalling 3 (SOCS3) with the regulation of inflammatory mediators in obese mice.

In vivo experiments on C57BL/6J mice were performed and animals were treated as following: i) DIO mice, either fed chow diet (CD) or high-fat diet (HFD) for 4 or 16 weeks (wk); or ii) pharmacological hyperleptinemia mice (LEP), daily injected intraperitoneally with 100 µg of leptin for 9 (LEP9) or 15 days (LEP15) or saline. Ovaries were collected and mRNA and protein isolated for further studies.

DIO 16wk increased both mRNA and protein of PTP1B and SOCS3 ($P<0.05$). Regarding LEP treatment, the same was found after LEP15 for mRNA and protein of PTP1B and SOCS3 ($P<0.05$), what suggests the activation of the signaling pathways mediating LEP resistance establishment in our comparative systems. Subsequently, we studied the signature of inflammatory markers in both protocols and we found that either in DIO 16wk and LEP15 the mRNA transcription of Tumor Necrosis Factor α (*Tnf*), Interleukin 1 β (*Il1b*) and Interleukin 6 (*Il6*) was upregulated ($P<0.05$).

In conclusion, increased expression of inflammatory mediators in both protocols invite us to speculate about the role of PTP1B and SOCS3 on pathology establishment in the ovary of obese mice. What is more, increased leptin signalling inhibitors PTP1B and SOCS3 might further determine functional impairment, which is currently under investigation.

Work supported by National Science Centre (2014/15/D/NZ4/01152) awarded to AG.

Motion characteristics and membrane integrity of boar spermatozoa differing in freezability

Ruchliwość i integralność błon plazmatycznych plemników knura z ejakulatów o różnej przydatności do zamrażania

Fraser L.* , Zasiadczyk Ł., Wasilewska K., Filipowicz K., Karpiesiuk K.

Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;

*fraser@uwm.edu.pl

Male variability in semen freezability is one of the main factors affecting sperm cryo-survival in different animal species. In this study, different sperm quality parameters were used to characterize boars with good and poor freezability semen (GFS and PFS, respectively).

Semen, collected from 18 Polish Large White boars, was frozen using a cryopreservation protocol. Motion characteristics of frozen-thawed spermatozoa, analyzed by the computer-assisted sperm analyzer (CASA) system, included total and progressive motility (TMOT and PMOT, respectively), velocity straight line velocity (VSL), velocity average path (VAP), linearity (LIN), straightness (STR) and rapid movement (RAP). Besides the CASA-analyzed sperm motion patterns, assessments of the sperm membrane integrity included mitochondrial membrane potential (JC-1/PI assay), plasma membrane integrity (SYBR-14/PI assay), normal apical ridge (NAR) acrosome integrity, DNA fragmentation and lipid peroxidation (LPO).

ANOVA results showed that boar × freezability group significantly affected most of the analyzed sperm quality characteristics following freezing-thawing. Using the post-thaw sperm quality characteristics, 10 boars were classified as GFS (n=10), whereas 8 boars were considered as PFS (n=8). Higher post-thaw sperm TMOT, PMOT and RAP movement, exhibited by boars with GFS, were concomitant with greater proportions of spermatozoa with VSL, VAP, STR and LIN values compared to boars with PFS. Furthermore, the membrane integrity of frozen-thawed spermatozoa was less compromised in boars with GFS, as indicated by higher functional mitochondria, plasma membrane integrity (SYBR-stained sperm cells) and NAR acrosome integrity, and reduced LPO and DNA fragmentation.

The combination of sperm quality parameters, employed in this study, showed marked variations in the sperm cryo-survival between the freezability groups, being significantly higher in boars with GFS.

Supported by the NCN project (2015/19/B/NZ9/01333).

Effect of thymosin on survival of vitrified porcine oocytes
Wpływ tymozyny na przeżywalność witryfikowanych oocytów świni

Gajda B.*, Poniedziałek-Kempny K., Rajska I., Smorąg Z.

*Department of Biotechnology of Animal Reproduction, National Research Institute of Animal Production,
Balice/Kraków;*

*barbara.gajda@izoo.krakow.pl

Thymosin (TH) is biological active polypeptide released by thymus. It protects cells from damage and blocks apoptosis. In our recent study we demonstrated that supplementation of IVM medium for pig oocytes with synthetic TH increased the number of matured oocytes and had positive effect on quality of pig IVF blastocyst (Gajda *et al.*, 2015, Anim Reprod). The objective of the present study was to examine the effect of supplementation of IVM medium for oocytes with TH on survival of vitrified porcine oocytes.

Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained from ovaries of slaughtered gilts. COCs were selected and cultured in modified TCM-199 medium supplemented with 0.5 mg/ml of synthetic TH (LipoPharm.pl; exp. group) or without TH (control group) for 42 h at 39 °C and 5% CO₂. After maturation, oocytes were assessed and vitrified using the OPS method described by Gajda *et al.* (2015, CryoLett). Oocytes of good quality from exp. and control group were equilibrated in solution consisting of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 10% ethylene glycol (EG) diluted in TCM-199 for 3 min. Oocytes (5–6) with a minimum volume of vitrification solution (15% DMSO, 15% EG and 0.5 M sucrose) were loaded into the OPS straw. After 1 min, the straw was plunged into liquid nitrogen (LN₂). For warming, the OPS was quickly removed from LN₂, immersed in dilution solution (TCM-199 and sucrose) for 5 min and washed in TCM-199. Then, the oocytes were morphologically evaluated under a stereomicroscope. The results were analysed statistically with Chi-square test.

The survival rate of vitrified porcine oocytes matured in medium supplemented with 0.5 mg/ml of TH (exp. group) were higher (64/80, 80.0%; $P < 0.05$) than those of oocytes matured in medium without TH (control group; 78/120, 65.0%).

In conclusion, our data indicate that survival of porcine vitrified oocytes may be affected by their culture conditions. Further investigations regarding the *in vitro* fertilization of vitrified porcine oocytes matured with thymosin are required.

Supported by: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

Wpływ cytoplazmy selektywnie enukleowanych zygot na morfologię przeszczepionych jąder komórkowych

Influence of zygote cytoplasm after selective enucleation on morphology of transferred cell nucleus

Gręda P.^{1,*}, Kruś J.¹, Duszewska A.M.¹, Piliszek A.², Modliński J.A.²

¹Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

²Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, Jastrzębiec;

*pawel_greda@sggw.pl

W klasycznej metodzie enukleacji (McGrath i Solter, 1984, *Science*) usuwana jest całość przedjądrzy, tj. zarówno materiał genetyczny, jak i wszystkie czynniki zamknięte w obrębie otoczki przedjądrza (enukleacja całkowita — CE). W naszych doświadczeniach badaliśmy wpływ nowej metody enukleacji interfazowych zygot (Gręda i wsp., 2006, *Reproduction*), której istotnym następstwem jest wzbogacenie cytoplazmy enukleowanej komórki o elementy karioplazmy pochodzące z usuwanych przedjądrzy (enukleacja selektywna — SE). Bezpośrednim celem naszej pracy było zbadanie zmian zachodzących w morfologii jąder komórek dawców po ich transferze do cytoplazmy zygot enukleowanych obiema metodami.

Zygoty poddano enukleacji całkowitej (zygoty CE) albo enukleacji selektywnej (zygoty SE), a następnie przeszczepiono do nich jądra pochodzące z zarodka ośmioblastomerowego lub komórki pęcherzykowej. Po okresie sześciogodzinnej inkubacji w warunkach *in vitro*, rekonstruowane zarodki utrwalono i wykonano z nich preparaty mikroskopowe. Następnie, dokonano pomiaru promienia jąder komórkowych oraz ich jąderka i na tej podstawie obliczano objętość tych struktur.

Średnia objętość jąder komórek pęcherzykowych to $210,5 \mu\text{m}^3 (\pm 49,9)$. Po transferze do cytoplazmy selektywnie enukleowanej zygoty jądro komórkowe zwiększyło swoją objętość do średniej wartości $659,3 \mu\text{m}^3 (\pm 179,7)$. Obliczona średnia objętość jądra dla blastomerów 1/8 wyniosła $744 \mu\text{m}^3 (\pm 267)$, natomiast średnia objętość jąderka (jąderek) wyniosła $44,7 \mu\text{m}^3 (\pm 12,5)$. Po transferze tych jąder do zygot CE zwiększyły one swoją objętość do wartości $3264 \mu\text{m}^3 (\pm 1172)$, a średnia objętość jąderek wynosiła $55,9 \mu\text{m}^3 (\pm 33,9)$. Średnia objętość jąder transferowanych do zygot SE wynosiła $4276 \mu\text{m}^3 (\pm 1433)$, a średnia objętość jąderka zwiększyła się do wartości $472 \mu\text{m}^3 (\pm 326)$.

Powyższe wyniki pokazują, że cytoplazma selektywnie enukleowanej zygoty jest w stanie przemodelować transferowane jądro zarówno komórki somatycznej, jak i komórki zarodkowej. Materiał pseudojąderka uwalniany podczas selektywnej enukleacji przedjądrzy zygoty jest w stanie wnikać do transferowanego jądra i wpłynąć na wielkość jego jąderka.

Blastomere removal from cleaving mouse embryos affects long-term predisposition to obesity in adult males
Wpływ usunięcia blastomeru z zarodka myszy na występowanie otyłości u dorosłych samców

Kotlarska M.¹, Pęczkowicz-Szyska J.¹, Florek W.¹, Stankiewicz A.M.¹, Arena R.¹, Starzyński R.M.¹, Sampino S.^{1,2,*}, Modliński J.A.¹

¹*Department of Experimental Embryology,
Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Poland;*

²*Faculty of Veterinary Sciences, University of Teramo, Italy;*

*s.sampino@ighz.pl

Blastomere biopsy (BB) is an essential technique for performing preimplantation genetic diagnosis (PGD), which involves *in vitro* culture of cleaving embryos and removal of one/two blastomeres. Although, BB is considered safe, there is little knowledge about long-term health outcomes in children born after PGD. Previous studies have shown that BB causes increased body weight in mice. Therefore, we investigated the long-term effects of BB on phenotypic traits related to obesity.

Blastocysts were obtained following BB, following removal and re-introduction of one blastomere (sham-BB controls) and following *in vitro* culture only (IVC controls), and then transferred to pseudopregnant recipients. The obtained offspring (BB=60, sham-BB=39 and IVC=39) were analyzed for body weight development and behaviors related to obesity. Moreover, regulatory molecules involved in the energy balance system were analyzed in blood, fat tissues and hypothalamus, using ELISA and Real Time PCR. Experimental groups were compared using one-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests.

Male BB mice displayed increased growth rates during early post-natal life and showed increased body weight in adulthood, compared to sham-BB and IVC mice ($P<0.001$). Kidneys and liver weights, as well as fat depositions were also increased in BB compared to controls (kidneys $P<0.01$; liver, fat $P<0.001$). Moreover, BB displayed increased food intake ($P<0.05$) and increased sucrose preference ($P<0.01$). When provided with a wheel, no difference among groups were observed in the time spent running. However, while controls showed significant weight loss after 3 days of physical exercise, BB mice did not (BB $P>0.05$; sham-BB $P<0.05$; IVC $P<0.001$). In addition, we found significantly increased blood and fat leptin protein levels in BB compared to controls. There was no difference in expression of leptin, leptin receptor, orexin, neuropeptide Y and growth hormone genes, and an increased expression of the ghrelin gene, in the hypothalamus.

Our data indicate that BB causes imbalance between energy intake and energy expenditure in mice, suggesting that PGD procedures might represent a risk factor for obesity.

This study was supported by KNOW Leading National Research Centre Scientific Consortium "Healthy Animal-Safe Food".

The influence of motility stimulants on biological properties of cryopreserved dog semen

Wpływ dodatku stymulatorów ruchliwości na właściwości biologiczne kriokonserwowanych plemników psa

Lecewicz M.*, Strzeżek R., Majewska A., Kordan W.

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

*mlecew@uwm.edu.pl

The aim of this study was to determine the effect of semen extender supplementation with the motility stimulants on the selected quality parameters of the cryopreserved canine spermatozoa.

Two motility stimulants (caffeine, pentoxifylline) with the final concentrations: 5 mM, 10 mM and 20 mM were used. The sperm quality was evaluated for motility (CASA), mitochondrial function (JC-1/PI assay) and plasma membrane integrity (SYBR-14/PI) after 60 minutes of incubation at 37 °C.

Regardless of the used concentrations, all stimulants showed a positive effect on sperm motility. However, in semen extenders supplemented with the concentration of 10 mM of all used motility stimulants, the highest percentage of spermatozoa with progressive motility was observed. Furthermore, in case of mentioned concentration, the higher proportion of spermatozoa with active mitochondria was also noted. Moreover, no differences in plasma membrane integrity were observed irrespective of the concentration and active substances used.

Presented results can suggest that the addition of methylxanthines may increase levels of intracellular cAMP as the result of motility stimulants addition, except positive effect on sperm motility, may indirectly affect the mitochondrial transmembrane potential.

This work received financial support from the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (no. 11.610.003–300).

Effect of addition of a low molecular weight antioxidants to the diluent for freezing semen of the dog on selected quality parameters of cryopreserved spermatozoa

Wpływ dodatku niskocząsteczkowych antyoksydantów do rozrzedzalnika do mrożenia nasienia psa na wybrane wskaźniki jakościowe plemników poddanych procesowi kriokonserwacji

Lecewicz M.*, Strzeżek R., Majewska A., Kordan W.

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

*mlecew@uwm.edu.pl

The present study was conducted to evaluate whether supplementation of semen extender with Trolox (water-soluble vitamin E) and L-ascorbic acid (vitamin C) may have influence on the quality of frozen-thawed canine spermatozoa.

The following variants of extenders were used: 1) without additives (antioxidants) — control sample; 2) vitamin E 400 μM / 1×10^9 spermatozoa; 3) vitamin C 200 μM / 1×10^9 spermatozoa; 4) vitamin C + E, 200 + 200 μM / 1×10^9 spermatozoa; 5) vitamin C + E, 200 + 400 μM / 1×10^9 spermatozoa. The antioxidants were added to the chilled semen immediately before freezing. The sperm quality was evaluated for motility (CASA), mitochondrial function (JC-1/PI assay) and plasma membrane integrity (SYBR-14/PI).

Regardless of the used extender variant, there were no significant differences in the total sperm motility. However, the higher percentage of progressively motile sperm was observed in semen supplemented with the equal concentrations of vitamins C + E. Furthermore, in mentioned extender variant, the higher proportion of spermatozoa with an integral plasma membrane and active mitochondria was noted.

This results may indicate that the supplementation of the semen extender with a similar concentrations of the synergistically act vitamins may have a positive effect on a quality parameters of frozen-thawed canine spermatozoa.

This work received financial support from the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (no. 11.610.003–300).

Tworzenie Banku Nasienia Żubra — analiza właściwości strukturalnych i funkcjonalnych plemników przy użyciu cytometru przepływowego przed i po procesie kriokonserwacji

Creation of the Wisent Semen Bank — analysis of structural and functional properties of sperm before and after the cryopreservation process using a flow cytometer

Niżański W.^{1,*}, Partyka A.¹, Bielas W.¹, Prochowska S.¹, Duszewska A.M.², Bielecki W.³, Olech W.⁴

¹Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

²Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

³Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

⁴Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;

*wojtek.nizanski@gmail.com

Jednym z najważniejszych działań programów zachowania puli genowej gatunków zagrożonych wyginięciem jest prowadzenie Banku Genów. W Polsce, Żubr *Bison bonasus* podlega ścisłej ochronie gatunkowej, przez co niezwykle istotnym elementem strategii ochronnej jest założenie oraz prowadzenie Banku Nasienia Żubra jako zabezpieczenie przyszłości gatunku. Celem badań była ocena skuteczności protokołu kriokonserwacji nasienia najądrzowego żubra opracowanego w Katedrze Rozrodu, poprzez badanie parametrów jakościowych plemników, wykorzystując technikę cytometrii przepływowej oraz barwniki fluorescencyjne.

Materiał do badań stanowiło nasienie 12-tu dorosłych samców, eliminowanych ze stad w Puszczy Boreckiej oraz Białowieskiej. Nasienie pobierane było z ogona najądrzy poprzez nacinanie tkanki oraz wypłukiwanie plemników rozrzedzalnikiem. Po wstępnej ocenie pobranych plemników próbki dzielono na 2 części, jedną poddając ocenie jako próbki świeże, a drugą poddając procesowi kriokonserwacji. Przy użyciu cytometru przepływowego oraz fluorochromów ocenie poddawano: ciągłość błony komórkowej, uszkodzenia akrosomu, potencjał mitochondrialny, peroksydację lipidów, apoptozę oraz strukturę chromatyny.

Proces kriokonserwacji nasienia spowodował spadek zawartości plemników żywych o 21 punktów procentowych (pp) osiągając wartość 45%. Mrożenie nasienia powodowało nieznaczny wzrost uszkodzeń akrosomów, peroksydacji lipidów oraz apoptozy w plemnikach, które przeżyły proces mrożenia. Aktywność mitochondriów była niska zarówno w nasieniu świeżym, jak i rozmrożonym. Proces mrożenia zwiększył zawartość plemników z uszkodzoną chromatyną o 5 pp.

Podsumowując, opracowana procedura kriokonserwacji nasienia żubra obniżając w pewnym stopniu jakość plemników *in vitro*, stwarza jednak dobrą perspektywę rozwoju części programów ochrony puli genowej żubrów. Możliwość zastosowania kriokonserwowanego nasienia żubrów do inseminacji lub zapłodnienia *in vitro*, a następnie do embriotransferu stanowi potężne narzędzie w ratowaniu ginącego gatunku.

Zastosowanie metody Rapid-I do kriokonserwacji oocytów klaczy **Application of Rapid-I method for cryopreservation of equine oocytes**

Nowak A.^{1,*}, Kochan J.¹, Okólski A.¹, Witkowski M.¹, Witariski W.², Młodawska W.¹

¹*Instytut Nauk Weterynaryjnych, Uniwersytet Rolniczy Kraków;*

²*Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, Instytut Zootechniki PIB, Kraków-Balice;*

*nowak.a.a@gmail.com

Pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków uwarunkowane jest dostępem do dużej ilości gamet. Oocyty po pozyskaniu muszą być bezpośrednio wykorzystane do dalszych procedur, ponieważ wraz z upływem czasu obniżają się ich zdolności do zapłodnienia. Konieczność zapłodnienia komórek w krótkim odstępie czasu od pozyskania można wyeliminować dzięki witrifikacji. Zamrożone oocyty mogą być przechowywane przez nieograniczony czas nie tracąc przy tym swoich zdolności do zapłodnienia. Dzięki temu po rozmrożeniu mogą być użyte do procedur *in vitro*. Celem pracy było określenie kompetencji rozwojowych oocytów klaczy witrifikowanych metodą Rapid-I, aktywowanych partenogenetycznie lub poddanych zapłodnieniu wspomaganym ICSI.

Pozyskane poubojowo oocyty klaczy poddano dojrzewaniu IVM do stadium metafazy II. Następnie oocyty witrifikowano metodą Rapid-I (Vitrolife) przy użyciu mediów EquiProVitKit (Minitube). Po rozmrożeniu oocyty aktywowano partenogenetycznie kombinacją jonomycyny i 6DMAP lub poddano zapłodnieniu wspomaganemu metodą ICSI. Zarodki końskie hodowano w pożywce TCM 199 Hepes buffered uzupełnionej 10% FBS. Ocenę zarodków przeprowadzano codziennie na podstawie morfologii i podziałów zarodków (CR-cleavage rate). Dane statystyczne były porównywane przy pomocy testu chi-kwadrat. W przypadku małych grup uwzględniono poprawkę Yatesa.

Aktywacji partenogenetycznej poddano 204 oocyty. W grupie doświadczalnej procent podziałów zarodkowych wyniósł 10.4%, w grupie kontrolnej natomiast 36% ($P < 0,001$). W drugim etapie oocyty po witrifikacji poddano zapłodnieniu ICSI. W grupie doświadczalnej (witrifikowane oocyty) stwierdzono 20% podziałów zarodkowych, w grupie kontrolnej natomiast 33,3% dzielących się zarodków ($P < 0,001$).

Wczesny rozwój zarodkowy po zapłodnieniu i aktywacji partenogenetycznej przebiega podobnie, dlatego też metoda ta może być wykorzystywana do oceny potencjału rozwojowego witrifikowanych oocytów. Zastosowana w doświadczeniu procedura witrifikacji oocytów klaczy metodą Rapid-I pozwala na zachowanie kompetencji rozwojowej oocytów poddanych aktywacji partenogenetycznej lub zapłodnieniu metodą ICSI.

Effect of spermatozoa hyperactivity after capacitation on *in vitro* fertilization effectiveness of boar semen — preliminary results

Wpływ hiperaktywności plemników po kapacytacji na efektywność zapłodnienia *in vitro* nasieniem knura — wstępne wyniki

Poniedziałek-Kempny K.*, Rajska I., Gajda L., Gajda B.

Department of Animal Reproduction Biotechnology, National Institute of Animal Production, Balice/Krakow;

*katarzyna.kempny@izoo.krakow.pl

Hyperactivated spermatozoa are described as a vigorous and non-linear movement caused by an increased amplitude of flagellar beats. Without hyperactivity spermatozoa are not able to penetrate the *zona pellucida* and as a consequence they are not able to fertilize. The aim of this study was to estimate the influence of spermatozoa hyperactivity after capacitation on *in vitro* fertilization results of boar semen.

The semen was obtained from 7 boars of various breeds. The collected sperm was diluted in Biosolwens Plus (Biocheffa, Poland). The semen progressive motility and hyperactivity was evaluated before and after capacitation by using SCA. Semen underwent capacitation in a medium based on TCM-199 (1 h incubation in 39 °C and 5% CO₂ in the air). *In vitro*-matured oocytes were fertilized with semen from selected boars 1 and 2 with different hyperactivity. Presumptive zygotes were cultured in NSCU-23 medium up to the blastocyst stage.

It was found that the semen progressive motility of 7 boars before capacitation oscillated between 48 and 82% and semen hyperactivity oscillated between 7 and 28% while after capacitation progressive motility was 50–79% and semen hyperactivity was 25–79%. Semen of two selected boars (1 and 2) exhibited similar motility (70%) but different hyperactivity: boar 1- high (79%), boar 2- low (45%) and after capacitation were used for IVF. The cleavage rate of boar 1 was 35% and the blastocysts rate was 22% while the cleavage rate of boar 2 was 42% and no blastocysts developed. Statistical analysis was performed using the χ^2 and t tests. There were no significant differences between boars in cleavage and blastocyst rate.

In conclusion, the evaluation of hyperactivity of spermatozoa after capacitation may be useful for the estimation of boar semen fertilization ability; however, further research on bigger experimental material is needed to be performed.

Supported in part by Fund of Own Research of IZ PIB no. 07–2.06.7 (2015–2017) and Predoctoral Research Funded by Ministry of Agriculture no. 11–0.07.1 (2015–2016).

Effectiveness of collagenase type IA in domestic cat ovarian follicles enzymatic isolation protocol

Efektywność kolagenazy typ IA w procedurze enzymatycznej izolacji pęcherzyków jajnikowych kota domowego

Rodak O.*, Partyka A., Nizański W.

*Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine,
Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Wrocław;*

*olga.rodak@upwr.edu.pl

The aim of the study was to examine usefulness of collagenase type IA for ovarian follicles (OF) isolation from domestic cat ovarian cortex tissue.

Ovarian cortex round pieces, 0.2 cm in diameter were used in the study. Series of experiments were performed to obtain optimal settings during collagenase type IA tissue digestion. DPBS was used as a basic medium. Concentration of collagenase was 1 mg/ml. Incubations were performed at 37 °C. Viability evaluation of OF was performed using fluorescent dyes — Calcein/EthD-1.

Experiment 1: Effect of incubation time on OF isolation. Method: 6 groups with different incubation period: 15, 30, 45, 60, 75, and 90 min. Result: Only pieces from group 60, 75, 90 min released single OF. Cortex's fragments were dissolved, with still lots of OF tightly embedded in the tissue.

Experiment 2: Impact of tissue preparation. Method: 2 groups: 1) whole pieces, 2) chopped pieces, with 3 different incubation periods were used in each group (1, 1.5, and 2 h). After digestion, tissue fragments were removed and samples were centrifuged. Result: Group 2 showed two times more of digested material in comparison to group 1. Single OF was found after staining. 2 h of incubation had negative impact on OF morphology in both groups.

Experiment 3: Impact of digestive medium supplementation. Method: 3 groups of different supplements: 1) 1% BSA, 2) 5 mM Ca²⁺, 3) BSA and Ca²⁺ were used. Result: Amount of digested material increased in 2 and 3 groups, but no difference in OF number was observed. OF morphology was better in group 1 and 3.

Experiment 4: Impact of tissue quality (age, cycle phase). Selected protocol (chopped tissue, 1.5 h of incubation, BSA and Ca²⁺ addition) was repeated 5 times using tissue from various females. Result: No improvement was observed.

In conclusion, domestic cat ovarian tissue enzymatic digestion protocol based only on collagenase type IA is inefficient. Probably the use of different collagenase types combination is required for successful cat ovarian follicles isolation.

Supported by statutory research funds no B030/0046/16 assigned to the Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

Can epigenetic transformation of nuclear donor cells contribute to the preservation by inter-species (porcine→bovine or caprine→porcine) cloned embryos of their competences to develop extracorporeally to the blastocyst stage?

Czy epigenetyczna transformacja komórek-dawców jąder może przyczynić się do zachowania przez międzygatunkowe (świńsko→bydłęce lub kozio→świńskie) zarodki klonalne pozaustrojowych kompetencji rozwojowych do stadium blastocysty?

Samiec M.*, Skrzyszowska M., Opiela J.

Department of Animal Reproduction Biotechnology, National Research Institute of Animal Production, Balice n. Kraków;

*marcin.samiec@izoo.krakow.pl

The present research was undertaken to ascertain whether inter-family and inter-genus (porcine→bovine; P→B or caprine→porcine; C→P) nuclear-transferred (NT) embryos can acquire and retain their developmental capabilities to reach the blastocyst (B) stage under *in vitro* culture conditions.

To create inter-species (P→B or C→P) cloned embryos, enucleated *ex vivo*-matured heifer/cow oocytes (ooplasts; Group I) or gilt/sow ooplasts (Group II) were subzonally microinjected and subsequently electrofused either with adult pig bone marrow-derived mesenchymal stem cells (APBM-MSCs) that had been epigenomically modulated by 24-h exposure to 50 nM trichostatin A (TSA; Group I) or with adult goat peripheral blood-derived fibroblast-like cells (AGPB-FLCs) that had been exposed to 350 nM scriptaid (SCPT) for 24 h (Group II). Efficiently electroactivated P→B or C→P nuclear-ooplasmic hybrids were cultured to the morula (M) and B stages for 168 to 192 h.

Among 116 inter-species NT embryos assigned to Group I, 84 (72.4%)^a were able to divide *in vitro*. The percentages of embryos that progressed to the M and B stages were 34/116 (29.3%)^a and 12/116 (10.3%)^a, respectively. In Group II, out of 127 hybrid NT embryos, 89 (70.1%)^a underwent cleavage divisions, but 34 (26.8%)^a and 11 (8.7%)^a developed to the M and B stages, respectively (^{a,a} $P \geq 0.05$; χ^2 test).

Summing up, inter-species NT embryos that had been reconstructed either with bovine ooplasts and TSA-treated APBM-MSC nuclei or with porcine ooplasts and SCPT-treated AGPB-FLC nuclei did not exhibit failure to complete *ex vivo* development to the B stage. Additionally, due to desirable enhancement of donor cell nuclear reprogrammability, the strategies of not only TSA-mediated epigenetic transformation of APBM-MSCs, but also SCPT-mediated epigenetic transformation of AGPB-FLCs gave rise to both maintenance by P→B or C→P NT embryos of the relatively high M formation rates and acquisition of developmental competences to reach the B stage.

Perspective: The use of inner cell mass exchange for the study of placenta-mediated adult diseases

Perspektywa: Wykorzystanie wymiany komórek wężła zarodkowego do badania chorób, w których pośredniczy łożysko

Sampino S.^{1,2,*}, Loi P.², Modliński J.A.¹

¹*Department of Experimental Embryology,*

Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec, Poland;

²*Laboratory of Experimental Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Teramo, Teramo, Italy;*

*s.sampino@ighz.pl

Growing evidence links an individual's susceptibility of adult chronic diseases to adverse events during prenatal intrauterine life. In this context, the placenta has a pivotal role in mediating fetal development. Therefore, alterations in its functions may underlie later disease occurrence. During pre-implantation embryo development, the blastocyst is composed of two cell lineages, the inner cell mass (ICM) and the trophoblast (TR), which give rise to the fetus and to the placenta, respectively. Chimeric complementation of ICM and TR consists in the transfer of ICM into empty trophoblastic vesicles, which give rise to live offspring in animal experiments. Here, we propose the use of chimeric complementation by ICM-exchange between embryos belonging to normal and disease-carrying mouse strains, to study the placenta-mediated developmental programming and its influence on postnatal health. The obtained offspring could be analyzed for the presence of disease symptoms, in order to investigate a possible pathogenic role of the placenta. Moreover, we suggest some methodological advances for the generation of chimeric blastocyst by the use of *in vitro* cultured trophoblastic stem cells.

Understanding how the placenta participates in the programming of adult phenotypic features may unveil novel targets for developing interventions aimed to at-risk pregnancies that may effectively prevent later disease onset.

This study was supported by KNOW Leading National Research Centre Scientific Consortium "Healthy Animal-Safe Food".

The effects of oxytocin or PGF₂α added to boar semen on reproductive performance of sows artificially inseminated in summer

Wpływ dodatku oksytocyny lub PGF₂α do porcji nasienia knura na wskaźniki reprodukcyjne loch inseminowanych w miesiącach letnich

Schwarz T.^{1,*}, Jaros P.¹, Tuz R.¹, Nowicki J.¹, Małopolska M.¹, Murawski M.², Bartlewski P.M.³

¹*Department of Swine and Small Animal Breeding,*

²*Department of Animal Biotechnology, University of Agriculture in Krakow, Krakow, Poland;*

³*University of Guelph, Department of Biomedical Sciences, Guelph, Ontario, Canada;*

*rzschar@cyf-kr.edu.pl

Summer is the least favorable season for swine reproduction mainly due to long photoperiods and heat stress. Such conditions negatively impinge on the reproductive system of sows and boars, manifesting in debilitated uterine and gonadal function. This situation is further exacerbated by relatively low levels of bioactive factors in extended semen doses used for AI. Ultimately, there is a noticeable decline in piglet productivity of summer-breeding sows. Hence, the aim of this study was to determine the effect of oxytocin or prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) added to boar semen extender on reproductive performance of sows AI'd during summer.

A total of 144 sows were divided into 3 groups: groups E1 and E2 (n=48 each) inseminated with semen doses supplemented with 20 IU of oxytocin or 5 mg PGF_{2α}, respectively; forty eight animals served as controls (group C). Fertilization rate was determined ultrasonographically on gestational day 28. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple-range test to determine the differences between individual mean values.

The duration of insemination was greater (P<0.05) in C (141±12 s) compared with E1 and E2 (117±12 and 116±13 s, respectively). Group E1 sows exceeded (P<0.05) C animals in conception (CR) and farrowing (FR) rates (CR: 97.9±0.02% and 83.3±0.05%; FR 91.7±0.04% and 75.0±0.06%, respectively); the values for both variables in E2 sows were intermediate (P>0.05; CR: 93.8±0.04% and FR: 83.3±0.05%) although a difference between E2 and C approached to significance (P<0.10). The mean litter size was greater (P<0.05) in E2 compared with C sows (12.5±0.4 and 10.8±0.5 piglets/sow, respectively); however, the mean litter size in E1 group (12.0±0.6 piglets/sow) tended to be greater (P<0.10) than that recorded in C.

The present results demonstrate beneficial effects of both hormones added to boar semen extender on reproductive performance of sows inseminated in summer months.

Supported by DS 3265 (Dept. of Swine and Small Animal Breeding).

Zastosowanie liofilizowanej frakcji lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia jako składnika rozcieńczalnika do konserwacji plemników najądrzowych psa

The use of lyophilised lipoprotein fraction extracted from ostrich egg yolk (LPFo) in the extender used for cold storage of canine epididymal spermatozoa

Strzeżek R.*, Dawid P., Kordan W.

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn;

*rafi@uwm.edu.pl

W ostatnim okresie wskazuje się na możliwość szerszego wykorzystania najądrzowych plemników psa w technologiach reprodukcyjnych tego gatunku zwierząt (Luvoni i wsp., 2017, *Reprod Domest Anim*). Wymaga to jednak optymalizacji technik konserwacji tych plemników m.in. poprzez stosowanie rozwiązań umożliwiających wydłużanie czasu ich przeżywalności. Celem badań była ocena wpływu różnych stężeń lipoproteinowej frakcji izolowanej (LPF_o) z żółtka jaja strusia afrykańskiego (Patent RP Nr 217869) na właściwości biologiczne najądrzowych plemników psa poddanych konserwacji w stanie płynnym.

Materiał do badań stanowiły plemniki pozyskane z najądrzy od 12 psów (różnych ras) poddanych standardowej kastracji. Uzyskane plemniki poddawano konserwacji w stanie płynnym (5 °C) z zastosowaniem rozcieńczalnika Tris — cytrynian — fruktoza (TCF) zawierającego różne stężenia LPFo (2.5%, 5%, 7.5%, 10%) oraz 20% żółtka jaja kurzego (TCF-HEY) stanowiącego próbę kontrolną. Analizy plemników wykonywane w 1, 3 i 5 konserwacji obejmowały wspomaganą komputerowo ocenę ruchliwości (CASA), określenie integralności błon plazmatycznych (SYBR-14/PI) oraz ocenę statusu błon mitochondrialnych (JC-1/PI).

Wraz z upływem czasu konserwacji we wszystkich wariantach zaobserwowano postępujące zmiany strukturalne plemników. Omawiane zjawisko przejawiało się obniżeniem odsetka plemników ruchliwych (TMOT) i wykazujących ruch postępowy (PMOT) oraz odsetka plemników z zachowaną integralnością plazmolemy i funkcjonalnymi mitochondriami. W 5. dniu konserwacji najwyższymi wartościami TMOT i PMOT charakteryzowały się próby plemnikowe zawieszone w TCF zawierającym 5% LPFo oraz TCF-HEY.

Uzyskane wyniki są zgodne z rezultatami naszych wcześniejszych badań, przeprowadzonych na ejakulowanych plemnikach psa. Wskazują także na możliwość zastosowania frakcji LPFo jako składnika rozcieńczalnika stosowanego w konserwacji najądrzowych plemników psa.

Praca wykonana w ramach badań statutowych UWM 11.610.003–300.

**Wpływ wysokiej częstotliwości ejakulacji na jakość nasienia oraz wybrane
biochemiczne wskaźniki plemników i plazmy nasienia psów**
**Effect of high ejaculation frequency on semen quality and some biochemical
parameters of sperm and seminal plasma of dogs**

Strzeżek R.^{*}, Orzeł I., Siemieńczuk J., Kordan W.

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn;

*rafi@uwm.edu.pl

Intensywna eksploatacja płciowa może wpływać na obniżenie liczby plemników w ejakulacie oraz powodować szereg istotnych zmian w sekrecji biochemicznych wyznaczników nasienia. Prowadzić to może do ograniczenia zdolności zapładniającej plemników (Strzeżek i wsp., 2000, *Theriogenology*). Celem badań była ocena wpływu wysokiej częstotliwości ejakulacji psów na jakość nasienia oraz biochemiczne właściwości plemników i plazmy nasienia.

Materiał do badań stanowiły pełne ejakulatory pozyskiwane od 5 psów w odstępach 24-godzinnych przez 5 dni. Podczas 6 miesięcznego okresu poprzedzającego doświadczenie nie prowadzono kolekcji ejakulatów. Każdorazowo po pobraniu określano objętość ejakulatu (OBJ) i koncentrację plemników (KONC). Analizy plemników obejmowały ocenę ruchliwości (CASA), fluorescencyjne określenie integralności błon plazmatycznych i statusu błon mitochondrialnych oraz oznaczanie zawartości ATP. Badania biochemiczne plazmy nasienia dotyczyły oznaczania zawartości białka ogólnego (TCP) oraz aktywności fosfataz: alkalicznej (AP) i kwaśnej (AcP).

Wykazano, że pozyskiwanie nasienia od psów w odstępach 24 godzinnych przez 5 dni prowadzi do stopniowego obniżenia OBJ i KONC. Stwierdzono natomiast wzrost odsetka plemników o ruchu postępowym, z zachowaną integralnością plazmolemy i funkcjonalnymi mitochondriami. Omawianemu zjawisku towarzyszył wzrost zawartości ATP w plemnikach. W plazmie nasienia wykazano jednak obniżenie TCP oraz aktywności AP i AcP.

Wyniki badań wskazują, że intensywna eksploatacja płciowa psów, obok zmian wskaźników ilościowych i jakościowych nasienia, powodować może zakłócenia sprawności sekrecyjnej najądrzy i gruczołu krokowego. Stanowić to może główną przesłankę do opracowania osobniczo uwarunkowanego programu częstotliwości ejakulacji psa, zwłaszcza w przypadku wykorzystywania nasienia do kriokonserwacji lub inseminacji.

Praca wykonana w ramach badań statutowych UWM 11.610.003–300

Post-thaw viability of boar spermatozoa treated with fractionated seminal plasma prior to freezing

Przeżywalność kriokonserwowanych plemników knura przechowywanych w różnych frakcjach plazmy nasienia przed zamrażaniem

Wasilewska K.*, Zasiadczyk Ł., Fraser L.

*Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Animal Bioengineering,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*karolina.wasilewska@uwm.edu.pl

The quality of post-thaw semen is affected by different factors such as male variability, sperm treatment and extender composition. This study investigated the effects of different seminal plasma (SP) fractions on the viability of boar spermatozoa following cryopreservation.

The sperm-rich fractions (SRFs), collected from three PLW boars, were divided into three parts following analysis. Chromatographically fractionated SP comprising proteins less than 40 kDa (SP 1) and more than 40 kDa (SP 2), and the whole SP (wSP) were used to treat sperm samples, prior to extension with BTS extender and freezing. At post-thaw, the Vybrant Apoptosis Assay Kit was used to identify three sub-populations of spermatozoa categorized as viable (YO-Pro-1⁻/PI⁻), apoptotic (YO-Pro1⁺/PI⁻) and necrotic (YO-Pro1⁺/PI⁺) in conjunction with the assessment of the plasma membrane integrity (SYBR-14/PI assay), total and progressive sperm motility (TMOT and PMOT, respectively) and the acrosome status (FITC-PNA/PI assay).

ANOVA results showed that there were significant interactions between boar and treatment for most of the analyzed sperm viability parameters following freezing-thawing. When analyzed within boar, sperm samples supplemented with either SP 1 or SP 2 demonstrated significantly higher percentages of viable, membrane-intact spermatozoa (YO-Pro-1⁻/PI⁻ and SYBR-14⁺/PI⁻) compared with those of the wSP after freezing-thawing. The percentages of frozen-thawed spermatozoa with plasma membrane apoptotic-like changes (YO-Pro1⁺/PI⁻) significantly differed among the SP fractions and wSP in each boar. Furthermore, post-thaw sperm TMOT, PMOT and acrosome status were better maintained in the sperm samples treated with either SP fraction.

The findings of this study confirmed that holding of boar semen in fractionated SP, prior to freezing, significantly increased the sperm cryo-tolerance.

Supported by a NCN project (2016/21/N/NZ9/02289) and funds from UWM in Olsztyn (11.610.003.300).

Laparoscopic method of oocytes' recovery in pig (L-OPU in pig)

Uzyskiwanie oocytów świń metodą laparoskopową OPU

Wieczorek J.* , Cegła M., Poniedziałek-Kempny K., Rajska I., Soból K.

Department of Animal Reproduction Biotechnology, National Research Institute of Animal Production, Balice;

*jarosław.wieczorek@izoo.krakow.pl

The aim of the study was to develop a low-invasive, repeatable and effective laparoscopic method of oocytes recovery in pigs that would be further used for *in vitro* fertilization (L-OPU in pig).

Eight gilts from one herd were the donors of the oocytes. Gilts were synchronized and superovulated. Oocytes were recovered laparoscopically — 6 times from each donor (total of 48 OPUs). Obtained oocytes were evaluated based on morphological criteria. Oocytes with homogeneous cytoplasm were accepted for *in vitro* maturation and fertilization while oocytes with heterogeneous cytoplasm were rejected.

A total of 491 ovarian follicles were aspirated, 326 oocytes were recovered (66% on average), and 281 oocytes (mean of 86% oocytes) were classified for *in vitro* maturation. Out of 109 fertilized oocytes 28 zygotes (26%) were obtained. As a control group served oocytes obtained from slaughterhouse ovaries. 713 *in vitro* mature control oocytes were *in vitro* fertilized, 103 oocytes cleaved (14.4%) and 26 embryos developed to blastocyst stage (3.6%).

Using the OPU laparoscopic method in pigs, it is possible to obtain oocytes capable for *in vitro* maturation and fertilization although their quality is lower than oocytes obtained by *post-mortem* in slaughterhouse. The method provides sufficient quantity of aspirated oocytes but it is necessary to continue its improvement to increase the quality of recovered oocytes.

Financial support: statutory activity of National Research Institute of Animal Production (NRIAP) No 02-014.1.

Blastomere biopsy as factor of risk for impaired fetal development in mouse model **Biopsja blastomeru jako czynnik ryzyka zaburzeń rozwoju zarodka na modelu myszy**

Zacchini F.^{*}, Arena R., Abramik A., Ptak G.E.

Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences, Jastrzebiec;

^{*}f.zacchini@ighz.pl

Preimplantation Genetic Diagnosis is commonly offered to infertile couple to select healthy embryos to be transferred *in utero*. The procedure involves the removal of one-two cells from cleaving embryos (Blastomere Biopsy — BB) and *in vitro* culture followed by transfer *in utero* once the result of PGD confirm their health status. Our previous studies showed increased body weight/size and impaired metabolic function in BB derived mouse offspring in adulthood. The onset of post-natal diseases can be the result of adaptation during *in utero* life. However, there is a limited knowledge on the effect of BB on fetal development. Here we evaluated development of BB mouse embryos after transfer to recipient females.

At 18.5 dpc fetuses and placentae were collected from females carrying biopsied and not-manipulated embryos (*in vitro* control — IVC). *In vivo* control group (CTR) consisted of embryos completely developed *in vivo*. Data were analyzed by One-way Anova test.

Our first observation was an increased pregnancy loss in both BB and IVC vs CTR ($P < 0.003$) and an increased incidence of congenital malformation/stillbirth in BB vs both IVC and CTR ($P = 0.04$). Furthermore, an increased placental weight in both BB and IVC vs CTR ($P = 0.0018$) while reduced fetal weight in BB vs both IVC ($P = 0.0003$) and CTR ($P < 0.0001$) was noted. The reduction of feto/placenta ratio was correlated with the invasiveness of the ART procedure used as it was lower in BB group compared to both IVC ($P = 0.045$) and CTR ($P < 0.0001$).

Our results showed that BB is associated with increased risk of low birthweight and reduced feto/placental ratio, suggesting perturbation of fetal development. Such developmental perturbations may predispose to the onset of metabolic disorders (*i.e.*, coronary heart disease, diabetes). Thus, our preliminary experiment suggest caution with the use of BB as a routine PGD test.

Supported by KNOW Leading National Research Centre — Scientific Consortium „Healthy Animal — Safe Food” (GA KNOW/IGHZ/RPB/WEW/2016/03 to FZ), National Science Centre Poland (GA 2015/19/D/NZ4/03696 to FZ), and European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Programme (GA 692185 to GEP).

Wpływ różnych wariantów rozcieńczalnika na przeżywalność kriokonserwowanych plemników knura

Effect of different semen extenders on viability of frozen-thawed boar spermatozoa

Zasiadczyk Ł.*, Kurpanik K., Fraser L., Filipowicz K., Kordan W.

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn;

*lukasz.zasiadczyk@uwm.edu.pl

Celem badań była analiza wpływu różnych wariantów rozcieńczalnika na właściwości biologiczne kriokonserwowanych plemników knura, z uwzględnieniem sposobu kolekcjonowania nasienia.

Materiał do badań stanowiły ejakulatory (n=15) pochodzące od 3 knurów. Ejakulatory dzielono podczas pobierania na dwie części: gęstą frakcję nasienia oraz pozostałość ejakulatu. Próby nasienia poddawano procesowi zamrażania-rozmrażania. Po rozmrożeniu, próby nasienia zawieszano w rozcieńczalniku Androhep® Plus (AHP) lub BTS i analizowano po upływie 15, 60 oraz 120 minut. Wspomagana komputerowo analiza ruchliwości plemników (CASA) obejmowała ogólną ruchliwość (TMOT), ruch postępowy (PMOT), prędkość uśrednioną (VAP), prędkość prostoliniową (VSL) oraz prędkość krzywoliniową (VCL). Do oceny funkcjonalności mitochondriów (MMP) i integralności plazmolemy plemników (PMI) wykorzystano, odpowiednio, barwienia fluorochromami JC-1/PI oraz SYBR-14/PI.

Analiza wariancji wykazała, że zmienność uwarunkowana osobniczo, sposób kolekcjonowania nasienia, warianty rozcieńczalnika oraz czas inkubacji miały znaczny wpływ na większość analizowanych parametrów przeżywalności kriokonserwowanych plemników. Obserwowano znaczne zmiany w analizowanych parametrach przeżywalności plemników pomiędzy wariantami rozcieńczalnika i frakcjami ejakulatu nasienia po 120 minutach inkubacji, niezależnie od sposobu kolekcjonowania nasienia. Omawiane zmiany przejawiały się istotnie wyższą wartością TMOT, PMOT, MMP oraz PMI w próbach nasienia pochodzącego z gęstej frakcji po 120 minutach inkubacji w rozcieńczalniku AHP w porównaniu do rozcieńczalnika BTS. Zaobserwowano istotne różnice w parametrach prędkości VAP, VSL i VCL pomiędzy wariantami rozcieńczalników.

Uzyskane wyniki badań mogą wskazywać, że rozcieńczalnik AHP przyczynia się do zachowania większego odsetka ruchliwych plemników o integralnych błonach plazmatycznych, poddanych procesowi kriokonserwacji.

Pracę realizowano w ramach badań statutowych UWM w Olsztynie (11.610.003.300).

The influence of *kappa*-opioid receptor agonist on transcriptomic changes in the anterior pituitary cells of gilts during mid-luteal phase of the estrous cycle

Wpływ agonisty receptora opioidowego *kappa* na zmiany transkryptyczne w komórkach przedniego płata przysadki loszek w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego

Czelejewska W.*, Żmijewska A., Dziekoński M., Okrasa S.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury, Olsztyn;*

*w.czelejewska@gmail.com

Endogenous opioid peptides (EOPs) are crucial regulatory factors of female reproductive functions. EOPs exert their action mainly at the hypothalamic level, but they can also affect pituitary activity in auto- or paracrine manner. Our previous study revealed that *kappa*-opioid receptor agonist (U-50.488) can inhibit secretion of LH and FSH from the porcine anterior pituitary cells *in vitro*. The aim of this study was to identify alterations in gene expression in cultured porcine pituitary cells in the presence of U-50.488.

Cells isolated from anterior pituitaries of cross-bred gilts (Large White × Polish Landrace; n=2x4) on Days 8–12 of the estrous cycle were incubated with U-50.488 (10^{-7} mol/L) or without treatment (control). Total RNA isolated from these cells was used for microarray study (Porcine V2 Gene Expression Microarray, 4x44K, Agilent Technologies). The obtained data were analyzed by means of GeneSpring GX and bioinformatic tools.

The study revealed significant changes in expression of 253 genes ($FC \geq 1.2$, $P < 0.05$); 200 were up-regulated and 53 down-regulated in cells incubated with U-50.488 vs. control conditions. Among others, *BMP15* and *RASGRP2* gene expression appeared to be down-regulated. Interestingly, *BMP15* encodes factor that may stimulate FSH secretion by pituitary cells. In turn, *RASGRP2* might be involved in VIP/PACAP-dependent prolactin promoter activation. Furthermore, we observed up-regulation of *P2RX1* and *NCOA4* genes coding for encoding purinergic receptor and androgen receptor coactivator, respectively. Moreover, among differentially expressed genes, there were also those encoding transcription factors (*GTF2H3*, *STAT1*, *TAF5*, *TAF4B*), as well as components of chemokine (*CCL22*, *CX3CR1*, *SOS2*, *SRC*) and calcium (*ADRA1B*, *CACNA1S*, *HTR4*, *PLN*) signaling pathways.

In conclusion, presented microarray data indicate specific genes that may play an important role in opioid-induced changes in secretion of the anterior pituitary hormones.

Supported by Grant No. 12.620.009–300, UWM Olsztyn.

Analiza składu moczu suk w różnych fazach cyklu jajnikowego, w kontekście poszukiwania aktywnych substancji semiochemicznych u psa domowego (*Canis familiaris*)

Evaluation of the urine composition of bitches during different phases of the ovarian cycle, in the context of the search for active semiochemical substances in a domestic dog (*Canis familiaris*)

Dzięcioł M.^{1,*}, Szumny A.², Nizański W.¹, Jezierski T.³, Woszczyło M.¹, Pieczewska B.¹

¹Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

²Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

³Zakład Zachowania się Zwierząt, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, Jastrzębiec;

*michal.dzieciol@upwr.edu.pl

Badania opublikowane przez Goodwina i wsp. (1979, *Science*) wskazywały, iż głównym feromonem płciowym suk jest metyl paraben (4-hydroksybenzoesan metylu). Niemniej, przeprowadzone w ostatnich latach przez różnych badaczy, jak również przez nasz zespół doświadczenia dowodzą, iż metyl paraben nie wykazuje działania stymulującego na zachowania płciowe samców psa domowego. Celem doświadczenia była ocena zmian w składzie moczu suk w poszczególnych fazach cyklu jajnikowego, w kontekście poszukiwania substancji semiochemicznych.

W toku badań, analizie techniką HS-SPME/GC-MS (ang. *headspace solid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry*) poddano ponad 100 próbek moczu zebranych od różnych samic podczas poszczególnych faz cyklu jajnikowego. Fazę cyklu potwierdzano poprzez ocenę objawów klinicznych, cytologię pochwy oraz analizę poziomu progesteronu.

W przebadanych próbkach pochodzących z okresu *estrus* zaobserwowano podwyższony poziom związków aromatycznych karbonylu, takich jak acetofenon (hipnone) i benzaldehyd. Ponadto wykazano zwiększoną koncentrację metyloketonów, np. butanon, 2-pentanon, 3-heksanon. Jednocześnie, w *estrus* zaobserwowano znaczący spadek stężeń związków siarczkowych: 1-metylotiopropanu; 1-metylotiobutanu, 1-metylotipenta lub trisiarczan-di-metylu, które to z kolei wykazywały podwyższony poziom w okresie *diestrus*.

Obserwacja ta sugeruje możliwość występowania podwójnego charakteru mechanizmu wzajemnego oddziaływania między samcami i samicami podczas rui. Mechanizm ten może się opierać o oczywiste przywabiające i pobudzające działanie feromonów płciowych, ale i odstraszaające działanie związków siarczkowych pojawiających się w pozostałych fazach cyklu. W przeciwieństwie do Goodwina i wsp. (1979), nie stwierdzono parabenów w badanych próbkach. Dalsze badania obejmujące testy behawioralne są wskazane w celu weryfikacji aktywności semiochemicznej zidentyfikowanych substancji i potwierdzenia lub wykluczenia prawdziwości tezy o dualnym mechanizmie interakcji w okresie rui pomiędzy samicą i samcem.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant No. UMO-2015/17/B/NZ8/02411.

**Cellular function of membrane estrogen receptor and its mechanism of action
in bank vole testis**

**Błonowy receptor estrogenowy — rola i mechanizm działania
w gonadzie męskiej nornicy rudej**

Hejmej A., Kamińska A., Pardyak L., Pawlicki P., Miłoś A., Bilińska B., Kotula-Balak M.*

*Department of Endocrinology, Institute of Zoology and Biomedical Research,
Jagiellonian University in Kraków;*

*malgorzata.kotula-balak@uj.edu.pl

Besides canonical nuclear estrogen receptors (ERs), G-protein-coupled estrogen receptor 30 (GPR30) is involved in estrogen action. It induces rapid signaling *via* activation of *e.g.*, extracellular signal-regulated kinase (ERK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), cAMP, intracellular calcium (Ca²⁺) stores, interleukins and interferons as well as metalloproteinases (MMPs). As further understanding of GPR30 role in male gonad and its regulation by estrogens currently remains elusive, this study was carried out to investigate the above issue using the unique rodent experimental model — the bank vole. In this seasonally breeding animal, the level of sex steroid hormones is physiologically regulated, being significantly decreased during reproductive system regression (short day; SD) in comparison to actively reproducing voles (long day; LD).

Testes of mature LD and SD bank voles (n =30) were fixed in paraffin or frozen for gRT-PCR, immunohistochemical and biochemical analyses. Statistical analyses were performed on raw data using Statistica 10 software.

Based on immunohistochemical results, GPR30 was expressed in testicular somatic and spermatogenic cells of both LD and SD voles. GPR30 mRNA expression, but not protein expression appeared to be photoperiod-dependent. A specific cellular localization and expression of GPR30 was correlated with the expression of ERK, protein kinase A (PKA), and MMP 9. However, activity of these proteins differed significantly among each other and was dependent on vole reproductive status. Moreover, the expression of signaling enzymes was associated with differences in the levels of cAMP, cGMP and Ca²⁺ between LD and SD voles.

Our study shows that in bank vole GPR30 plays rather secondary than overriding role in the regulation of seasonal testis activity.

Supported by a grant SONATA BIS5 2015/18/E/NZ4/00519 from National Science Centre, Poland.

Effect of central injection of donepezil on the bacterial endotoxin induced suppression of GnRH/LH secretion in ewes during the follicular phase of the estrous cycle

Wpływ centralnej iniekcji donepezilu na zahamowaną działaniem endotoksyny bakteryjnej sekrecję GnRH/LH u owcy w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego

Herman A.P.^{1,*}, Skipor J.³, Król K.¹, Bochenek J.¹, Krawczyńska A.¹, Antushevich A.¹, Kopycińska K.², Romanowicz K.², Tomaszewska-Zaremba D.²

¹Department of Genetic Engineering,

²Department of Animal Physiology,

The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna;

³Department of Local Physiological Regulations, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

*a.herman@ifzz.pl

An immune stress induced by bacterial infection can inhibit the reproductive functions acting on different levels of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Pro-inflammatory cytokines are thought to be a key mediator of inflammation at the hypothalamic level. It was described that pharmacological inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity suppressed the synthesis of these cytokines reducing the inhibitory effect of inflammation on the GnRH and LH secretion. However, the influence of AChE inhibitors may also be the effect of the increased hypothalamic accumulation of ACh because the presence of cholinergic receptors was found in this area. The aim of the study was to examine whether inhibition of AChE activity by the central injection of AChE inhibitor (donepezil) will reduce the effect of immune stress on GnRH/LH secretion.

The study was performed on ewes divided into 4 groups (n=6 for each group): control (saline, *iv.*), donepezil-treated (5 mg/animal, *icv.*), LPS-treated (400 ng/kg, *iv.*), and donepezil- (*icv.*) and LPS- (*iv.*) treated during the synchronized follicular phase. Half hour prior to LPS/saline treatment, the animals were *icv.* injected with donepezil/Ringer's solution. Ewes were euthanized 3 h after LPS/saline injection. Blood concentration of LH, FSH and cortisol was assayed by RIA. Real-Time PCR was used to determine the gene expression of GnRH and GnRHR in the preoptic area (POA), anterior hypothalamus, medial basal hypothalamus (MBH) and median eminence (ME) as well as LH β , FSH β and GnRHR in anterior pituitary (AP). All data, after passing normality and homogeneity of variances tests, were subjected to a two-way analyses of variance (ANOVA) to determine any significant influences of two parameters (donepezil-treatment, inflammation) followed by Fisher's least significant difference post-hoc test.

Donepezil injection abolished ($P \leq 0.05$) suppressive effect of LPS on gene expression of *GnRH* in the POA and ME, and *GnRHR* but only in the ME. It also reduced ($P \leq 0.05$) the effect of immune stress on the LH and FSH secretion without affecting cortisol release.

The study showed that central injection of donepezil effectively diminished negative effect of inflammation on GnRH/LH secretion in ewe.

Supported by the funds granted by National Science Centre based on the decision no DEC-2013/11/B/NZ9/01848.

Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on juxtacrine signaling in male gonad

Wpływ środowiskowych związków o aktywności hormonalnej na sygnalizację jukstakrynową w gonadzie męskiej

Kamińska A.*, Pardyak L., Miłoś A., Pawlicki P., Kotula-Balak M., Bilińska B., Hejmej A.

*Department of Endocrinology, Institute of Zoology and Biomedical Research,
Jagiellonian University in Krakow;*

*ala.kaminska@doctoral.uj.edu.pl

Bisphenol A (BPA) and dibutyl-phthalate (DBP) are chemicals that accumulate in the environment and can negatively impact on endocrine system and male reproductive functions in mammals. However, the mechanism of their action in the testis is still not fully understood. The Notch signaling pathway involved in juxtacrine communication is an important regulator of proliferation and differentiation in several tissues, including testis. We postulated that this pathway may be a target for endocrine disruptors and aimed to examine the effects of BPA and DBP on the expression of Notch1 receptor, its ligand Dll-4 and the effector genes Hes-1 and Hes-5 in rat testis.

The study was performed on testis explants isolated from adult Wistar rats and cultured *in vitro*. Based on the results of dose-response experiment explants (n=4) were treated with 2.5×10^{-5} M BPA, 10^{-5} M DBP or a vehicle for 24 h. Real-time RT-PCR and semi-quantitative Western blot (WB) were used for the analyses of Notch1, Dll-4, Hes-1 and Hes-5 expressions at mRNA and protein level, respectively. Statistical analyses were performed by ANOVA, followed by Dunnett's *post hoc* comparison test.

Real-time RT-PCR and WB analyses revealed upregulation of Notch1 and Dll-4 at the mRNA and protein level in the testis explants after BPA ($P < 0.001$; $P < 0.01$, respectively) and DBP ($P < 0.05$) when compared to the control. Decrease of Hes-5 mRNA and protein expression was demonstrated after BPA treatment ($P < 0.001$; $P < 0.01$), whereas after DBP treatment Hes-5 level increased ($P < 0.05$). No changes in Hes-1 expression were observed following BPA and DBP exposures.

Taken together, these data provide evidence that both BPA and DBP affect Notch signaling in rat testis which indicates an adverse effect of both chemicals on the juxtacrine communication in the male gonad. This may be considered as a novel mechanism mediating impairment of testicular functions following exposure to endocrine disrupting chemicals.

Supported by grant K/DSC/003959.

The participation of noradrenaline and β -adrenergic receptors in the secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ from the inflamed endometrium in gilts
Udział noradrenaliny oraz receptorów β -adrenergicznych w sekrecji prostaglandyny $F_{2\alpha}$ z zapalnie zmienionego endometrium świni

Meller K.A.^{1,*}, Całka J.², Jana B.¹

¹*Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

²*Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, Olsztyn;*

*k.meller@pan.olsztyn.pl

Uterine inflammation is a common disorder in domestic animals leading to disturbances in reproductive processes. Noradrenaline (NA) affects the prostaglandins (PGs) secretion from healthy uterus acting by α - and β -adrenoreceptors. A role of NA and its β -adrenoreceptors in the PGs release from inflamed uterus is not known. In this study we examined the influence of NA and β 1-, β 2-, β 3-adrenergic receptor antagonists on the $PGF_{2\alpha}$ secretion from the inflamed porcine endometrium.

On Day 3 of the estrous cycle, either 50 ml of saline (SAL group, n=5) or *Escherichia coli* (*E. coli* group, n=5) suspension were infused into each uterine horn of gilts. Endometrial explants, obtained 8 days later, were incubated for 4 h with NA (10^{-5} M) alone, or together with β 1-, β 2- or β 3-adrenergic receptor antagonist (10^{-4} M). $PGF_{2\alpha}$ content in medium was determined by ELISA. The one-way of variance followed by the Bonferroni test were applied to compare the mean statistical values of the probes.

Acute endometritis developed in all bacteria-inoculated gilts. After administration of NA alone, there was an increase in $PGF_{2\alpha}$ release from endometrium of both SAL ($P<0.001$) and *E. coli* ($P<0.05$) groups compared to untreated tissues. However, $PGF_{2\alpha}$ release was lower ($P<0.001$) in the inflamed than in saline-treated tissues. NA-induced $PGF_{2\alpha}$ secretion from endometrium was lower ($P<0.001$) in the presence of β 2- or β 3-adrenergic receptor antagonists in the saline-treated gilts. $PGF_{2\alpha}$ secretion from the inflamed endometrium was decreased after incubation with NA and β 1- ($P<0.01$) or β 2- ($P<0.001$) adrenergic receptor antagonists compared to the effect of NA alone.

Obtained data show the weaker ability of NA to stimulate $PGF_{2\alpha}$ secretion from the inflamed endometrium as well as partially different receptor mechanism of this effect. These findings may be important to explain the role of β -adrenergic receptors in the regulation of secretory function of uteri with inflammation.

Supported by the National Science Centre (grant No. 2014/15/B/N25/03572) and funds of the Polish Academy of Sciences.

The influence of acetylcholine and its cotransmitters on the prostaglandin (PG)F_{2α} release by the inflamed porcine endometrium

Wpływ acetylocholino oraz jej kotransmiterów na sekrecję prostaglandyny (PG)F_{2α} z zapalnie zmienionego endometrium świni

Meller K.A.^{1,*}, Całka J.², Miciński B.², Jana B.¹

¹*Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

²*Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury, Olsztyn;*

*k.meller@pan.olsztyn.pl

Uterine inflammation generates an increase in prostaglandin (PG) synthesis and secretion. A role of acetylcholine (ACh), major parasympathetic neurotransmitter, and its cotransmitters in these processes is unknown. We studied the participation of ACh, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin (SOM), and their receptors in the PGF_{2α} release by the inflamed gilt endometrium.

On Day 3 of the estrous cycle, either 50 ml of saline (SAL group, n=5) or *Escherichia coli* (*E.coli* group, n=5) suspension were infused into each uterine horn. Eight days later endometrial explants were incubated for 24 h with ACh (10⁻⁵ M) alone, or together with MR2, MR3 or NR7 receptor antagonists (10⁻⁴ M), with VIP (10⁻⁷ M) alone or together with VPAC1 or VPAC2 receptor antagonists (10⁻⁶ M), and with SOM (10⁻⁷ M) alone or together with sst2 or sst5 receptor antagonists (10⁻⁶ M). PGF_{2α} content in incubation media was determined by ELISA and analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni test.

Infected gilts developed acute endometritis. ACh decreased (P<0.05) PGF_{2α} release in SAL group, while increased (P<0.001) in *E.coli* group, compared to the untreated tissues. ACh together with NR7 receptor antagonist increased (P<0.01) PGF_{2α} release in SAL group compared to the ACh alone. ACh with antagonists of MR2, MR3 or NR7 decreased (P<0.001) it in *E.coli* group. VIP increased PGF_{2α} release in SAL (P<0.05) and *E.coli* (P<0.001) groups, compared to the untreated tissues. This effect was stronger (P<0.05) in the inflamed than saline-injected uteri. Antagonist of VPAC2 receptor with VIP led to a drop in PGF_{2α} secretion in SAL (P<0.05) and *E.coli* (P<0.001) groups, compared to the VIP alone. In *E.coli* group PGF_{2α} secretion was lower (P<0.001) also in response to antagonist of VPAC1 receptor with VIP. PGF_{2α} release in both groups was similar after the use of SOM and its receptor antagonists.

Our data show that ACh and VIP stimulate PGF_{2α} secretion by the gilt inflamed endometrium and that the receptor mechanism of this effect is partially different than in healthy uterus.

Supported by the National Science Centre (grant No. 2014/15/B/N25/03572) and funds of the Polish Academy of Sciences.

Evaluation of phosphorylation degree in seminal plasma proteins from preserved stallion semen identified by 2D-PAGE electrophoresis

Określenie nasilenia stopnia fosforylacji białek plazmy konserwowanego nasienia ogiera metodą elektroforezy 2D-PAGE

Mietelska K.^{*}, Orzolek A., Wysocki P., Kordan W.

Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,

^{*}katarzyna.mietelska@uwm.edu.pl

Processes of protein phosphorylation/dephosphorylation may regulate sperm maturation, capacitation, acrosome reaction and fertilization. The aim of this study was to isolate phosphoproteins from stallion seminal plasma obtained from semen stored for 3 days at +5 °C.

Ejaculates were collected from 4 warm blood stallions in breeding and non-breeding season. Semen was diluted with Equipro extender and stored for 3 days in the liquid state at +5°C. Phosphoproteins, from fresh seminal plasma and diluted semen, were isolated using affinity chromatography on PhosSelect Iron Affinity Gel. Obtained proteins were separated by 2D-PAGE electrophoresis according to the method of O'Farrel *et al.* (1975, *J Biol Chem*) in 3–10 pH range. Gels stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 were analyzed using PDQuest programme. The evaluation of phosphoproteins expression was based on changes in the optical density of protein spots in the gels.

In seminal plasma obtained during breeding season there were identified 22 proteins with molecular weight from 66.9 to 9.0 kDa and pI from 8.98 to 3.89 which were expressed among the whole time of semen preservation. Four of mentioned fractions (54.8 kDa, 8.13 pI; 28.8 kDa, 5.75 pI; 16.1 kDa, 8.98 pI; 12.9 kDa, 8.96 pI) are probably associated with the season. Moreover, the presence of 13 polypeptides in the range of 55.3–10.6 kDa and 8.33–3.92 pI, whose expression changed during the time of storage, was also ascertained in the studied fluid. By contrast, in seminal fluid from non-breeding period 21 phosphoproteins were observed; three of which were present only in mentioned fluid *i.e.*, 17.1 kDa, 3.65 pI; 16.5 kDa, 4.77 pI and 14.9 kDa, 6.49 pI. We demonstrated also the presence of 12 polypeptides in the range of 31.2–10.6 kDa and 8.33–3.92 pI with different phosphorylation states.

Phosphoprotein profiles of stallion seminal plasma change within the time of semen storage and probably according to the season.

Supported by UWM in Olsztyn (11.610.003–300).

**Central effect of allopregnanolone on adrenocorticotropin secretion in sheep;
a pilot study**

**Ośrodkowy wpływ allopregnanolonu na sekrecję adrenokortykotropiny u owiec;
badanie pilotażowe**

Misztal T.^{*}, Hasec M., Górski K., Marciniak E., Roszkowicz-Ostrowska K.

The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna;

^{*}t.misztal@ifzz.pan.pl

Allopregnanolone (AL) is a progesterone derivative, synthesized in the central nervous system (CNS) and placenta of pregnant females. It is suggested that this compound reduces the stress response of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and its effects on developing fetus. This pilot study was designed to verify the hypothesis that AL decreases adrenocorticotropin (ACTH) secretion in non-pregnant sheep subjected to the infusion of this compound into the third ventricle of the brain (IIIv).

Twelve ewes of the Polish Longwool sheep were used in the experiment. They were implanted with stainless steel cannula into the IIIv a month before the experiment. Infusions were performed on days 8–10 of the estrous cycle after the previous synchronization of estrus by the Chronogest CR method and PMSG injection. Animals were divided into 3 groups (n=4 each): 1) control infusion; 2) AL infusion at 4 x 0.5 µg/60 µl/30 min, with intervals of 30 min (total of 2 µg); and 3) AL infusion at 4 x 6 µg/60 µl/30 min (total of 24 µg). Blood samples were collected every 10 min by a catheter inserted into the jugular vein. The effect of treatments on the plasma ACTH concentration was examined with the analysis of variance, following LSD-*post hoc* test, and on the parameters of pulsatile secretion with the non-parametric tests.

High levels of ACTH in peripheral blood were found in control ewes and in those receiving a lower dose of AL. However, the mean general and mean hourly concentrations of ACTH during the experiment as well as the frequency and amplitude of ACTH pulses were similar in both groups. As a result of the higher AL dose infusion, the mean plasma ACTH concentration and parameters of pulsatile secretion were significantly decreased ($P < 0.05$ - $P < 0.001$). Particular attention is drawn to the low level of ACTH seen already during the first infusion of a higher dose of AL.

The results show that AL, acting in the CNS, inhibits the release of ACTH from the pituitary to the peripheral circulation. This demonstrates the potential of AL to reduce the stress response of the HPA axis in sheep during periods of its increased synthesis *i.e.*, during pregnancy.

The research supported by the National Science Centre (Poland): Grant No. 2015/19/B/NZ9/03706.

Możliwości wystąpienia zjawiska melatoninooporności u owiec laktujących

Possibility of melatonin resistance in lactating sheep

Molik E.^{1,*}, Nahajło K.¹, Kordeczka K.¹, Misztal T.², Romanowicz K.², Zięba D.¹

¹*Katedra Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy, Kraków;*

²*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, Jabłonna;*

*rzmolik@cyf-kr.edu.pl

Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie czy wprowadzenie egzogennej melatoniny w okresie ciąży przyczyni się do wystąpienia zjawiska melatoninooporności u owiec i umożliwi wydłużenie laktacji w okresie skracania się dnia.

Badania przeprowadzono na 40 sztukach owiec podzielonych na dwie grupy. Grupa 1 (n=20; grupa kontrolna utrzymywana w naturalnych warunkach długości dnia), Grupa 2 (n=20, wprowadzenie melatoniny egzogennej). Owce wykociły się w połowie czerwca. Pierwsze pobranie krwi przeprowadzono na 6 tygodni przed wykotem. Po zakończeniu pobrania, owcom z Grupy 2 wprowadzono implanty melatoniny (Melovine 18 mg), kolejne iniekcje wykonywano co 90 dni. Drugie pobranie krwi u owiec wykonano w 57. dniu laktacji, kolejne pobrania dokonywano co 28 dni. Matki doiono od 57 dnia laktacji (sierpień), aż do czasu zasuszenia (listopad). Oznaczenie stężenia melatoniny (MLT), prolaktyny (PRL) wykonano metodą RIA. Zmiany koncentracji hormonów przeanalizowano z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), przy użyciu testu Scheffes'a.

Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie melatoniny u owiec Grupy 1 wykazywało cechy rytmu sezonowego i wraz ze skracaniem się dnia i upływem laktacji ulegało wzrostowi (od $22,44 \pm 8,75$ pg/ml — sierpień, do $67,68 \pm 8,7$ pg/ml — listopad). Natomiast, u owiec Grupy 2 (z implantami melatoniny) stężenie MLT ulegało obniżeniu (od $106,46 \pm 10,7$ pg/ml — sierpień do $71,31 \pm 10,6$ pg/ml — listopad). Analizując zmiany sekrecji PRL u owiec z Grupy 2 stwierdzono, że PRL zachowywała cechy rytmu sezonowego, czyli wraz ze skracaniem się dnia i upływem laktacji stężenie ulegało obniżeniu (od $44,98 \pm 3,07$ ng/ml — sierpień, do $27,54 \pm 3,34$ ng/ml — listopad). Z kolei, u owiec poddanych działaniu MLT egzogennej już w okresie ciąży (Grupa 2), stężenie PRL w okresie skracania się dnia ulegało wzrostowi (od $17,17 \pm 2,07$ ng/ml — sierpień do $45,15 \pm 3,07$ ng/ml — listopad).

Przeprowadzone badania wykazały, że wprowadzenie w okresie ciąży sygnału dnia krótkiego (implanty melatoniny) może przyczynić się do wystąpienia melatoninooporności i wzrostu stężenia prolaktyny w okresie jesienno-zimowym.

Praca finansowana z działalności Statutowej DS. 3242/2017 KBZ/WHiBZ.

Transport miedzi w procesie spermatogenezy

Copper transport in spermatogenesis

Ogórek M.^{*}, Pierzchała O., Bednarz A., Grzmil P., Lendartowicz M.

*Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków;*

*m.ogorek1990@gmail.com

Celem badań było określenie poziomu ekspresji białek metabolizmu miedzi w rozwoju gonady męskiej na poziomie transkryptu i białka oraz zlokalizowanie białek metabolizmu miedzi w poszczególnych komórkach gonady męskiej.

Materiał do badań stanowiły myszy ze stada niekrewniaczego, z hodowli Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu Uniwersytetu Jagiellońskiego. W pracy wykorzystano trzy metody badawcze: reakcja immunohistochemicznej lokalizacji białek, reakcja Western blot oraz PCR w czasie rzeczywistym. Grupy wiekowe badanych myszy zostały tak dobrane, aby odpowiadały kluczowym momentom w rozwoju gonady męskiej. Było to 12 grup wiekowych, od 5. do 180. dnia życia samca. Dla każdej grupy wybrano przynajmniej 3 zwierzęta. Każdą reakcję powtórzono dwa i więcej razy. Do weryfikacji istotności statystycznej różnic pomiędzy grupami z rozkładem normalnym wykorzystano test ANOVA w wariacji testu *post-hoc* Tukey'a. Dla grup, które nie wykazały rozkładu normalnego, wykorzystano test analizy istotności statystycznej Kruskal-Wallis. W reakcji immunohistochemicznej zlokalizowano białka zaangażowane w metabolizm miedzi w poszczególnych komórkach budujących gonadę męską. W reakcji Western blot, porównano zmiany ilości białek metabolizmu miedzi w jądrze pomiędzy sześcioma najważniejszymi grupami wiekowym. W reakcji Real Time PCR analizowano zmiany poziomu ekspresji genów związanych z metabolizmem miedzi u dwunastu grup wiekowych badanych zwierząt.

Pokazaliśmy, że w obrębie kanalik plemnikotwórczego, białko ATP7A jest głównie obecne w przedmeiotycznych komórkach germinalnych (spermatocyty leptotenowe i pachytenowe) i w komórkach Sertoliego. Podczas procesu spermatogenezy profil ekspresji *Atp7a* odpowiada *Slc31a1* (importer miedzi) i *Atox1* (kodujący metalochaperon, który transportuje miedź od SLC31A1 do ATP7A i ATP7B). Taki wzór ekspresji sugeruje, że komórki germinalne pobierają miedź, a ATP7A chroni je przed nadmiarem tego pierwiastka. Z kolei, białko ATP7B jest obecne w komórkach Sertoliego, blisko miejsca połączenia z wydłużającymi się spermatydami, co może świadczyć o jego funkcji wyrzucania jonów miedzi w końcowym etapie spermatogenezy.

Ekspresja białek i genów metabolizmu miedzi w poszczególnych składowych gonady męskiej jest charakterystyczna dla danego stadium rozwoju komórek tworzących jądro i ściśle związana z funkcjonowaniem tych składowych.

Localization and expression of connexin 43 in the testis, epididymis and ductus deferens of the turkey (*Meleagris gallopavo*) with yellow semen syndrome

Lokalizacja koneksyny 43 w jądrze, najądrzu i nasieniowodzie indora domowego (*Meleagris gallopavo*) z syndromem żółtego nasienia

Pardyak L.^{1,*}, Kamińska A.¹, Górowska-Wójtowicz E.¹, Hejmej A.¹, Słowińska M.², Kotula-Balak M.¹, Ciereszko A.², Bilińska B.¹

¹*Department of Endocrinology, Institute of Zoology and Biomedical Research,
Jagiellonian University in Krakow;*

²*Department of Gamete and Embryo Biology, Institute of Animal Reproduction and Food Research,
Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

*laura.pardyak@doctoral.uj.edu.pl

Intercellular communication mediated *via* gap junctions has relevant role for male fertility through involvement in the regulation of cellular functions in mammalian reproductive tissues. Yellow semen syndrome (YSS) is endemic within the population of domestic turkey, characterized by lower semen quality. However, scarce information is available regarding the etiology of YSS at the cellular level. Therefore, we aimed to examine the expression of the most abundant gap junction protein, connexin 43 (Cx43) in the testis, epididymis and ductus deferens tissues of YSS turkeys compared with turkeys producing white semen (WS).

The study was performed on tissue samples collected from adult YSS (n=6) and WS (n=6) turkeys. Immunohistochemistry was used to localize Cx43 protein within the reproductive tissue cells, whereas gene expression was detected by qRT-PCR followed by Western Blotting (WB) to test protein expression. Statistical analyses were performed by Mann-Whitney U test

Immunohistochemical analysis revealed presence of Cx43-positive cells in all reproductive tissues of YSS and WS males. In both groups distribution pattern of Cx43 was similar. A positive signal of Cx43 appeared in Leydig, Sertoli and germ cells. Immunopositive staining was detected in the cytoplasm of cells, whereas nuclei were negative. Increased intensity of the staining was observed in the testis and decreased in the epididymis and ductus deferens of YSS compared to WS turkeys. Real-time RT-PCR and WB analyses revealed upregulation of Cx43 at the mRNA and protein level in the testis ($P<0.05$; $P<0.001$, respectively) and down-regulation of Cx43 in the epididymis and ductus deferens ($P<0.05$; $P<0.01$, respectively) of YSS compared to WS males.

Observed changes in the expression of Cx43 in the turkey reproductive tissues suggest a putative relationship between Cx43-mediated intercellular communication and appearance of the yellow semen syndrome.

Supported by a grant K/DSC/003970.

PPAR expression throughout the estrous cycle in the bovine endometrium

Profil ekspresji PPAR w endometrium krowy w przebiegu cyklu rujowego

Socha B.M.^{*}, Łupicka M., Szczepańska A.A., Korzekwa A.

Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn;

^{*}b.socha@pan.olsztyn.pl

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are a family of nuclear receptors composing three isoforms: PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ . The activity of PPARs can be modified by a number of endogenous compounds, including arachidonic acid (AA), its eicosanoid metabolites and synthetic ligands. Many studies have revealed that PPARs are involved in the regulation of reproductive processes at the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. Therefore, we hypothesized that PPARs gene expression vary in the bovine endometrium during certain days of the estrous cycle. The aim of this study was to determine the mRNA expression of PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ in the bovine endometrium throughout the estrous cycle.

Endometrial tissues were obtained *post mortem* from heifers on days 0 (estrus phase, n=6), 2–5 (early luteal phase, n=6), 8–12 (mid-luteal phase, n=6), 15–17 (late luteal phase, n=6) and 19–21 (follicular phase, n=6) of the estrous cycle. The mRNA expression was evaluated by real-time PCR. The results were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by a Bonferroni test.

PPAR γ mRNA expression fluctuated in the tissue depending on the studied days of the estrous cycle, whereas the transcript levels of PPAR α and PPAR β/δ did not show significant differences during the estrous cycle. We observed the highest PPAR γ mRNA expression at the estrus phase and the lowest expression at the mid-luteal phase. PPAR γ mRNA expression were detectable at similar levels during the late luteal and follicular phases compared to the early luteal and mid-luteal phases of the estrous cycle.

The overall results indicate the presence of PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ in endometrial tissues, but the mRNA expression of only PPAR γ demonstrated fluctuations throughout the estrous cycle, especially during estrus and mid-luteal phases. Our findings suggest a correlation between the expression of PPARs and ovarian steroids throughout the estrous cycle in the bovine endometrium.

Supported by the National Science Centre, grant OPUS 6 (2013/11/B/NZ4/04516).

Effects of arachidonic acid metabolites on PPAR and RXR expression in bovine uterine cells

Wpływ metabolitów kwasu arachidonowego na ekspresję PPAR i RXR w komórkach macicy krowy

Szczepańska A.A.*, Łupicka M., Socha B.M., Korzekwa A.

*Department of Biodiversity Protection,
Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

*a.szczepanska@pan.olsztyn.pl

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors belonging to the superfamily of nuclear receptors. Three isoforms have been described: alpha (PPAR α), beta/delta (PPAR β/δ), and gamma (PPAR γ). PPARs heterodimerize with retinoid X receptors (RXRs: RXR α , RXR β and RXR γ) and then bind to a PPAR-response element in the promoter of a target gene. PPAR activity can be modulated by several ligands, including arachidonic acid (AA) metabolites. We hypothesized that PPAR and RXR expression in bovine uterine cells is modified by AA metabolites. The aims of the study were to determine the effect of AA metabolites (prostaglandin [PG]E₂, PGF₂ α , leukotriene [LT]B₄, and LTC₄) on mRNA expression of PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , RXR α , RXR β , and RXR γ , in bovine epithelial, stromal, and myometrial primary uterine cells and in bovine stromal cells with silenced PPARs genes (N=10).

mRNA of the relevant isoforms was assessed by real-time PCR in bovine primary epithelial, stromal, and myometrial primary cell cultures treated with AA metabolites and in stromal cell cultures with silenced PPAR genes. Student's *t*-test was used to analyze mRNA expression data.

All PPARs and RXRs isoforms were expressed in cells. Prostaglandins significantly affected expression of PPARs only in stromal cells, whereas LTs modulated PPAR γ mRNA expression in epithelial and myometrial primary cells. Blockade of signal transduction through PPARs prevented interactions between AA metabolites and PPARs, but downregulated RXRs expression. No preferences in PPAR and RXR isoforms binding were observed. In primary stromal uterine cells, mRNA expression of RXRs was higher than that of PPARs. In uterine stromal cells in which intracellular signaling through PPARs was blocked, RXRs seem to take over the role of PPARs and are pivotal for cell functions.

The obtained results indicate that final transmission of the signal through the PPAR requires both PPAR and RXR in the PPAR-RXR complex.

Research supported by the National Science Centre, grant OPUS 6 (2013/11/B/NZ4/04516).

Characterization of stromal and perivascular mesenchymal stem or progenitor cells in porcine endometrium

Charakterystyka stromalnych i okołonaczyniowych mezenchymalnych komórek macierzystych lub progenitorowych w endometrium świni

Wiater J.^{1,*}, Wartalski K.², Karasiński J.¹

¹Department of Cell Biology and Imaging;

²Department of Endocrinology,

Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University in Krakow;

*jerzy.wiater@doctoral.uj.edu.pl

The uterus is an organ with outstanding ability to remodelling its two main compartments: the endometrium and myometrium. In human, endometrium undergoes about 400 cycles of shedding, proliferation and differentiation during female reproductive years. In human and mouse, uterus contains a population of stem/progenitor cells that likely contribute to endometrial regeneration during each reproductive cycle. They reside in perivascular, epithelial and stromal locations of the endometrial functionalis and basalis. We have managed so far to confirm the presence of clonogenic and multipotent cells that express transcripts of mesenchymal stem cells (MSCs) markers in the porcine endometrium. We aimed to identify the tissue distribution of cells expressing MSCs markers such as: CD29, CD44, CD90, CD105, CD140b and CD146, intermediate filaments vimentin and pluripotency marker Oct4 in the porcine endometrium using single immunofluorescence labelling and Western blotting.

Experiments were performed on cryostat and paraffin sections, and *in vitro* cultured endometrial cells isolated from the following gilts: 3 immature, 3 at secretory and 3 at proliferative phase of the estrus cycle.

In tissue sections all of MSCs markers were detected in the perivascular area of small vessels in the endometrium of immature pigs and adult animals. Moreover, cells cultured *in vitro* expressed CD29, CD44, CD90, CD105, CD140b and vimentin proteins, evidenced by Western blot, which supports our previous observations using RT-PCR. However, some stromal cells expressed CD29, CD105 and CD146 that were unevenly distributed throughout *stratum functionalis* and *basalis* of the endometrium.

Our results indicate that similarly to human and mice, endometrial MSCs are perivascularly located in porcine endometrium and suggest that stromal CD29⁺, CD105⁺ and CD146⁺ cells are more mature precursors originating from their perivascular ancestors.

Supported by the National Center of Science (grant No. NN 303 804 240) and Jagiellonian University in Krakow (grant No. K/DSC/003986).

The neuromodulatory action of obestatin on the NPY/AgRP and CART/ α -MSH neurons in sheep

Neuromodulacyjne oddziaływanie obestatyny na aktywność neuronów NPY/AgRP i CART/ α -MSH u owiec

Wójcik-Gładysz A.^{*}, Szlis M., Przybył B.J., Polkowska J.

Department of Animal Physiology, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna;

^{*}a.wojcik@ifzz.pl

The participation of peripheral peptides in the processes regulating the food intake (energy homeostasis) at the central nervous system (CNS) level remains unclear. The present study focuses on the role of obestatin in neuronal activity within the hypothalamic appetite-regulating network which can modulate the activity of gonadotrophic axis in ruminants.

The animals (peripubertal Polish Merino sheep; n=28) were randomly divided in two groups. The sheep in the control group received intracerebroventricular infusions of the Ringer-Lock solution, and the sheep in obestatin group were infused with obestatin (diluted in the Ringer-Lock solution) at 25 μ g/120 μ l/h. The series of four hourly infusions on three consecutive days were performed, and immediately after the experiment, the sheep were sacrificed. Selected brain regions were fixed *in situ* for further immunohistochemical analysis, while the remaining ones were frozen for Real Time RT-qPCR analysis of: *npy*, *agrp*, *cart*, *pomc*, *pam*, *npy1r*, *gpr39*, *α -msh1r*, *ghsr*, *obr*, and *ir* gene expression. Statistical data evaluations for gene expression were carried out using the nonparametric Mann-Whitney U-test, for IHC assays were carried out using the unpaired *t*-student test, $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Obestatin infusion elicited changes in the neuropeptide Y (NPY) neuronal network in the hypothalamus. The results obtained show that exogenous obestatin evoked an increase in *npy* and *agrp* mRNA expression in the mediobasal hypothalamus (MBH), while the immunoreactivity for NPY was decreased in the arcuate and periventricular nuclei. The increase in *cart* and *pomc* gene expression in the MBH was also observed. Moreover, increased levels of *gpr39* receptor and *npy* receptor 1 gene expression were evident in obestatin infused sheep.

Based on these results, it can be concluded that obestatin plays a role in the modulation of appetite-regulating network at the hypothalamus level in sheep. The obtained results suggest that the underlying mechanism may involve the modification of the activity of NPY/AgRP and CART/ α -MSH neurons in the arcuate nucleus.

Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on the kisspeptin receptor expression in pituitary cells of gilts during the estrous cycle

Wpływ gonadoliberyny (GnRH) na ekspresję receptora kisspeptyny w komórkach przysadki świń podczas cyklu rujowego

Żmijewska A.^{*}, Czelejewska W., Wrona K., Dziekoński M., Okrasa S.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury, Olsztyn;*

^{*}agata.zmijewska@uwm.edu.pl

Kisspeptin has been described as a key regulator of the female reproductive axis acting centrally *via* the kisspeptin receptor (KISSR). The stimulatory effect of kisspeptin on the secretion of gonadotropin releasing hormone (GnRH) has been well documented in many species, including the pig. The changes in the expression of KISSR in anterior pituitary of pigs during the estrous cycle have not been elucidated so far. Thus, the aims of this study were: 1) to determine the expression of KISSR in porcine pituitary cells and 2) to examine the effect of GnRH on KISSR expression in these cells. In addition, the influence of GnRH on viability of porcine cultured pituitary cells was evaluated.

Pituitary cells were isolated from gilts on selected days of the estrous cycle: 2–3 (n=4), 8–12 (n=5), 15–16 (n=5) and 18–20 (n=5). Cells were *in vitro* pre-cultured for 72 h and then incubated for the next 4 h without (control) or with GnRH (100 ng/ml). Total RNA was extracted from the cells, and KISSR gene expression was examined by Real Time PCR method. The viability of pituitary cells was determined by alamarBlue assay. Data obtained from Real Time PCR and cell viability measurements were analyzed by one-way ANOVA.

Kisspeptin receptor mRNA expression in the porcine pituitary cells on days 2–3, 8–12, 15–16 and 18–20 of the estrous cycle did not change significantly. GnRH down-regulated KISSR gene expression on days 8–12 of the estrous cycle, but was ineffective on other studied days of the cycle. In the study, GnRH had no effect on viability of cultured porcine pituitary cells.

In summary, the study indicates that GnRH may influence KISSR expression in porcine pituitary cells during the mid-luteal phase of the estrous cycle, but further research concerning kisspeptin/KISSR system involvement in the regulation of pituitary functions in gilts is required.

Supported by the National Science Centre, grant No. 2012/07/D/NZ4/04177.

Ekspresja i lokalizacja błonowych receptorów progesteronu — PGRMC w ścianie macicy i łożysku krowy

Expression and localization of membrane bound progesterone receptors — PGRMC in the bovine uterine wall and placentome

Beyer N.M.¹, Kowalik M.K.^{2,*}, Kotwica J.², Kowalewski M.P.¹, Boos A.¹

¹*Institute of Veterinary Anatomy, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich, Switzerland;*

²*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn, Polska;*

*m.kowalik@pan.olsztyn.pl

Progesteron (P4) reguluje prawidłowy przebieg cyklu rujowego, implantację blastocysty i rozwój ciąży u wielu gatunków ssaków, w tym krów. Hormon ten wpływa na funkcje komórek na drodze genomowej i pozagenomowej przez błonowe receptory P4: PGRMC (*progesterone membrane receptor component*) 1 i 2 oraz mPR (*membrane progesterin receptor*) α , β i γ . Dotychczas wykazaliśmy pozagenomowy wpływ P4 na czynność komórek macicy krowy oraz zmienną ekspresję mRNA i białka błonowych receptorów P4 w komórkach endometrium i miometrium podczas cyklu rujowego. Ponadto, ekspresja mRNA dla *PGRMC1* i *PGRMC2* w pierwszym trymestrze ciąży była istotnie wyższa w porównaniu do cyklu rujowego, co sugeruje udział tych receptorów w regulacji czynności macicy w okresie ciąży. Jednak, niewiele wiadomo o ich lokalizacji i ekspresji w ścianie macicy i łożysku krowy podczas ciąży.

Celem badań było określenie komórkowej lokalizacji (immunohistochemia) oraz ekspresji mRNA (Real Time PCR) i białka (Western blot) receptorów *PGRMC1* i 2 w ścianie macicy i łożysku ciężarnej krowy. Materiałem do badań były skrawki macic pobrane poubojowo od krów w 1.-9. miesiącu ciąży ($n=5$ dla każdego miesiąca). Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu nieparametrycznej jednoczynnikowej analizy wariancji (test Kruskal-Wallis) za pomocą programu GrapPad PRISM 6.0.

W ścianie macicy wykazano najsilniejsze barwienie receptorów *PGRMC1* i 2 w komórkach nabłonka powierzchniowego, gruczołowych komórkach nabłonkowych, a także w śródbłonku naczyń krwionośnych. Natomiast, w komórkach mięśniowych i stromie barwienie było mniej wyraźne. W placentomach wykryto oba białka w części matczynej (stroma, nabłonek i komórki śródbłonka), jak również w śródbłonku naczyń krwionośnych części płodowej. *PGRMC2* dodatkowo ulegał ekspresji w nabłonku kosmówki część płodowej. Intensywność zabarwienia oraz poziom ekspresji mRNA i białka obu receptorów nie różniły się znacznie w czasie ciąży.

Uzyskane wyniki sugerują, że receptory *PGRMC* mogą być zaangażowane w czynność wydzielniczą nabłonka oraz regulację przepływu krwi w macicy i placentomach w okresie ciąży u krów.

Effects of periconceptual maternal undernutrition and folic acid supplementation on emotional behavior and problem-solving skills in lambs

Wpływ niedożywienia i suplementacji kwasem foliowym w okresie okołozapłodnieniowym na zachowania emocjonalne i umiejętność rozwiązywania problemów u jagniąt

Florek W.¹, Sampino S.^{1,2,*}, Chincarini M.², Sampino C.², Modliński J.A.¹, Loi P.²

¹*Department of Experimental Embryology, Institute of Genetics and Animal Breeding of the Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Poland;*

²*Faculty of Veterinary Medicine, University of Teramo, Teramo, Italy;*

*s.sampino@ighz.pl

Maternal Undernutrition (MU) and Folic Acid (FA) deficiency during pregnancy has been linked with the occurrence of neurodevelopmental disorders. In the present study, we aimed to examine the combined effects of periconceptual MU and FA supplementation on offspring behavior in sheep.

Three experimental groups of ewes were established: fed with 100% diet (CTR), fed with 50% food ratio (MU) and fed with 50% food ratio and supplemented with 15 mg/day FA (MU+FA). Ewes (n=6/group) were estrous-synchronized and subjected to different experimental factors from day 14 before mating until day 28 *post-coitum*. 30 days old lambs were subjected to the isolation test, in which the lamb was separated from the dam with a semitransparent fence for 5 minutes. The time spent by the lamb and the ewe in the proximity of the fence, as well as the number of jumps made by the lamb were examined. One week later, lambs were subjected to the detour test, which evaluate their ability to cross a V-shaped semitransparent obstacle in order to reach the dam on the opposite side. On the first testing day, lambs could freely detour the obstacle from both side and on the second day the preferred side was closed. Behavioral parameters of animals were evaluated using Salomon Coder software. Differences among groups were analyzed with Kruskal-Wallis test.

The lambs of the MU group displayed a decreased frequency of jumping ($P<0.05$) compared to control group, and increased frequency of entries in the proximity zone together with the mother ($P<0.05$) compared to the MU+FA group. In the detour test, all lambs successfully completed the task within 5 minutes and no difference among groups in the time spent to complete the task was observed.

Obtained results show that MU affected emotional responses to isolation and that FA supplementation reduced this effect, but does not improved learning and problem-solving abilities in the detour test.

Supported by Programme FIRB, GA no. B81J12002520001 Acronym: GenHome and KNOW Leading National Research Centre Scientific Consortium "Healthy Animal-Safe Food".

The effect of prokineticin 1 on the porcine conceptus during implantation process
Wpływ prokinetycyny 1 na komórki zarodka świni podczas procesu implantacji

Goryszewska E., Kaczyński P., Baryła M., Waclawik A.*

*Department of Hormonal Action Mechanisms, Institute of Animal Reproduction and Food Research,
 Polish Academy of Sciences, Olsztyn;*

*a.waclawik@pan.olsztyn.pl

Prokineticin 1 (PROK1), also called as endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) is among other factors responsible for angiogenesis and cell proliferation. Recently, the important role of PROK1 has been implicated in processes related with establishment of pregnancy in human. PROK1 acts *via* two G-protein coupled receptors PROKR1 and PROKR2, but preferentially activates PROKR1. The aim of the present research was to determine *PROK1* and *PROKR1* expression in the porcine conceptus and to study the effect of PROK1 on the conceptus cells.

Porcine conceptuses were recovered from uterus of gilts on days 10–12 (pre-implantation period; n=5), 14–19 (implantation period; n=9) and 20–25 (placenta development; n=5) of pregnancy. RNA was isolated by Total RNA Mini Plus kit, and was reversed to generate cDNA. Gene expression was determined by real-time PCR. Conceptuses from day 15 of pregnancy (n=3) were digested with trypsin for 0.5 h at 37 °C. Cells were seeded onto 96-wells plate and incubated for 24–48 h at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air. Subsequently, at 60–70% confluency, the cells were treated with 40 nM PROK1, 40 nM PROK1 + 1 μM PC7 (PROKR1 antagonist), 1 μM PC7 or vehicle for 24 h. After incubation with treatments, CellTiter 96[®] was added to the wells to study the cell proliferation. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by Tukey and Dunnett's tests (GraphPad Prism 7.0) for gene expression and cell proliferation, respectively.

Expression of *PROK1* was significantly greater in the conceptuses during implantation period and placenta development than in pre-implantation period (P<0.05), whereas mRNA content of *PROKR1* significantly increased in placenta development when compared with pre-implantation and implantation period (P<0.05). PROK1 significantly elevated conceptus cell proliferation (P<0.05). Co-treatment with PROKR1 antagonist diminished this effect of PROK1.

Results of the present study indicate that PROK1 and PROKR1 are important in the porcine conceptus during implantation and placenta development.

This study was supported by the grant of KNOW Consortium "Healthy Animal — Safe Food" (MS&HE; Decision No. 05–1/KNOW2/2015).

**Ekspresja elementów szlaku biosyntezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych
w błonie śluzowej macicy, zarodkach i trofoblastach świni**
**Expression of extracellular vesicles biogenesis pathway elements in the porcine
endometrium, embryos and trophoblasts**

Guzewska M.M., Kaczmarek M.M.*

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;

*m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl

Ostatnio prowadzone badania podkreślają nierozpatrywane dotychczas znaczenie regulacji funkcji błony śluzowej macicy (*endometrium*) bez angażowania procesów transkrypcji i translacji. Dużą rolę w tym mechanizmie przypisuje się pęcherzykom zewnątrzkomórkowym (EV), które transportują do innych komórek mRNA, miRNA oraz białka, zmieniając profil ekspresji genów w tkance docelowej. W niniejszych badaniach zbadano profil ekspresji elementów szlaku biosyntezy EV w błonie śluzowej macicy, zarodkach i trofoblastach świni. W tym celu wybrano szereg genów kodujących białka kompleksu ESCRT (ang. *endosomal sorting complexes required for transport*) oraz białka grupy RAB, które odgrywają istotną rolę podczas biosyntezy EV.

Do badań wykorzystano materiał pochodzący od loszek ciężarnych lub będących w cyklu rujowym. Z zabezpieczonych tkanek *endometrium* (dni [D] 11–12 i 15–16, n=5–9) oraz tkanek pochodzenia zarodkowego (D11, D12 i D15–16, n=3–8) wyizolowano mRNA, które posłużyło do oceny ekspresji badanych genów przy użyciu techniki real-time PCR. Analizę statystyczną wykonano stosując jedno- lub dwu-czynnikową analizę wariancji ANOVA.

W *endometrium* gen *RAB27A* wykazywał istotnie wyższą ekspresję podczas cyklu rujowego niż w ciąży (P=0,0079, D11–12), w przeciwieństwie do *RAB7B*, którego ekspresja była podwyższona w ciąży (P=0,0124, D15–16). Dla tkanek pochodzenia zarodkowego statystycznie istotne różnice zaobserwowano w przypadku trzech genów, tj. *VAMP8* (P=0,0320; D11 vs. D15–16), *VPS37B* (P=0,0029; D11 vs. D15–16) oraz *VPS4A* (P=0,0009; D11 vs. D12 i P<0,0001; D11 vs. D15–16).

Obserwowane zmiany w ekspresji genów kodujących białka szlaku biosyntezy EV wydają się być związane z odmiennym statusem reprodukcyjnym badanych zwierząt (cykl vs. ciąża) oraz postępującym rozwojem zarodków i wskazują na prawdopodobne zaangażowanie EV w komunikację między zarodkiem a matką na wczesnym etapie ciąży u świni.

Praca realizowana ze środków Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę — Bezpieczna Żywność”.

The influence of progesterone on orexin system protein expression in the porcine uterus during early gestation

Wpływ progesteronu na ekspresję białek systemu oreksynowego w macicy świni podczas wczesnej ciąży

Kamiński T.*, Dobrzyń K., Smolińska N., Kieżun M., Szeszko K., Kisielewska K., Rytelewska E.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn;*

*tkam@uwm.edu.pl

The relationship between nutritional status and reproductive success in animals has been studied for many years. There is a growing body of evidence to implicate the involvement of orexin system (orexin A – OXA, orexin B — OXB, orexin receptor type 1 — OX1R, and type 2 — OX2R) in the control of energy metabolism and reproduction. Our previous studies indicated changes in orexins and their receptors proteins expression during early pregnancy, which implies that their expression may be dependent on the local hormonal status, including concentration of steroid hormones. We hypothesize that one of steroids involved in this hormonal control is progesterone (P4). Thus, the aim of this study was to investigate the effect of P4 at the doses of 10, 100 and 1000 nM on orexins secretion and OX1R and OX2R proteins expression in the porcine endometrium and myometrium on days 15 to 16 and 27 to 28 of pregnancy (the beginning and the end of implantation, respectively).

OXA and OXB secretion was evaluated by ELISA method, while receptors proteins expression by Western blotting. Data were analyzed based on one-way ANOVA and LSD *post hoc* test.

In the endometrium, P4 was without effect on OXA and OXB release. On days 15 to 16 of gestation P4 inhibited both OX1R and OX2R protein concentration. At the end of implantation, P4 at lower doses suppressed OX1R expression and at higher doses enhanced OX1R and OX2R protein concentrations. In myometrial slices isolated on days 15 to 16, P4 at higher concentrations depressed both orexins secretion, whereas on days 27 to 28 its effect was negligible. At the beginning of implantation, P4 increased OX1R expression and inhibited OX2R protein content. At the end of implantation, the steroid generally suppressed OX1R expression and, dependently on the dose used, both increased and decreased OX2R protein concentration.

The obtained data strongly suggest that orexin system in the porcine uterus is regulated by systemic or locally produced progesterone.

Supported by National Science Centre (project no: 2011/03/B/NZ9/04187).

The effect of progesterone on prepro-orexin, orexin receptor type 1 and orexin receptor type 2 gene expression in the porcine uterus during the implantation period

Wpływ progesteronu na ekspresję genów prepro-oreksyny, receptora oreksyn typu 1 i receptora oreksyn typu 2 w macicy świni w czasie implantacji

Kieżun M.*, Dobrzyń K., Smolińska N., Szeszko K., Rytelewska E., Kisielewska K., Kamiński T.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn;*

*marta.kiezun@uwm.edu.pl

Reproductive success of animals is largely dependent on their metabolic status. Orexins A (OXA) and B (OXB) are hypothalamic peptides known for their role in the regulation of food intake and arousal. They derive by proteolytic cleavage from a common precursor called prepro-orexin (PPO). OXs action is mediated by two G-protein-coupled receptors: orexin receptor type 1 (OX1R) and type 2 (OX2R). Although the presence of OXs and OXRs was noted in the porcine uterus during early pregnancy, until now, there are no data on the regulation of orexin system gene expression. Therefore, the aim of this study was to examine the *in vitro* effect of progesterone (P4) at the doses of 10, 100 and 1000 nM on *PPO*, *OX1R* and *OX2R* mRNA content in the endometrial and myometrial tissue slices harvested on days 15 to 16 and 27 to 28 of gestation (the beginning and the end of implantation, respectively).

PPO, *OX1R* and *OX2R* gene expression was evaluated using the real-time PCR method. Data were analysed using one-way ANOVA followed by the Fisher's least significant difference *post hoc* test.

In endometrial tissue explants from days 15 to 16 of gestation, P4 (1000 nM) enhanced *OX1R* expression, whereas decreased *PPO* (100 and 1000 nM) and *OX1R* (100 nM) mRNA content. On days 27 to 28, P4 inhibited the expression of studied genes. In the myometrial slices collected on days 15 to 16 of pregnancy, P4 enhanced *PPO* (100 nM) and *OX2R* (10 nM) expression, and caused a decrease in *PPO* (1000 nM), *OX1R* (10, 100 and 1000 nM) and *OX2R* (100 nM). On days 27 to 28 of gestation, P4 increased the *PPO* and *OX1R* mRNA concentration, whereas decreased the expression of *OX2R*. The effect of P4 on *PPO*, *OX1R* and *OX2R* gene expression was dependent on the stage of pregnancy, type of tissue and P4 concentration.

The presented data may help to understand the mechanisms linking maternal energy metabolism and regulation of implantation process in pigs.

This research was supported by National Science Centre (project no: 2011/03/B/NZ9/04187).

Effect of orexin B on StAR, CYP11A1 and HSD3B1 gene expression and progesterone and androstenedione secretion by the porcine uterus during the peri-implantation period

Wpływ oreksyny B na ekspresję genów StAR, CYP11A1 i HSD3B1 oraz wydzielanie progesteronu i androstendionu przez macicę świń w okresie okołoinplantacyjnym

Kisielewska K.*, Rytelewska E., Kieżun M., Szeszko K., Dobrzyń K., Kamiński T., Smolińska N.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn;*

*katarzyna.kisielewska@uwm.edu.pl

Orexin B (OXB) is hypothalamic neuropeptide identified as a regulator of food intake, sleep-wake cycle and arousal. OXB and its receptors are expressed in porcine uterus. Gene expression of P450 side chain cleavage enzyme (*CYP11A1*), steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD3B1*) were also noted in porcine uterus. *De novo* synthesis of steroids in the uterus might be an important factor for effective implantation and maintenance of gestation. The aim of this study was to investigate the effect of OXB on progesterone (P₄) and androstenedione (A₄) secretion by porcine uterus as well as gene expression of enzymes involved in steroid production: *StAR*, *CYP11A1* and *HSD3B1* on days 15 to 16 (the beginning of implantation) and 27 to 28 (the end of implantation) of pregnancy.

Endometrial and myometrial explants were cultured *in vitro* in the presence of OXB (1, 10, 100 nM). *StAR*, *CYP11A1*, *HSD3B1* expression was evaluated using the real-time PCR method and secretion of the P₄ and A₄ was determined by radioimmunoassay. Data were analysed using one-way ANOVA followed by the Fisher's LSD *post hoc* test.

On days 15 to 16 of pregnancy OXB stimulated *StAR* and *HSD3B1* expression, as well as P₄ and A₄ secretion, whereas decreased *CYP11A1* mRNA content in the endometrium. In the myometrium, OXB stimulated *CYP11A1* expression and decreased *StAR* mRNA content. On days 27 to 28, OXB stimulated *CYP11A1* expression, P₄ and A₄ release, whereas inhibited *StAR* and *HSD3B1* expression in the endometrium. In the myometrium, OXB stimulated P₄ and A₄ secretion, decreased *CYP11A1* and *HSD3B1* mRNA content and dependently on the used dose both enhanced and suppressed *StAR* expression.

Our results indicate that OXB affects expression of key steroidogenic genes and production of steroid hormones by porcine uterus during the peri-implantation period.

This research was supported by National Science Centre (project no: 2011/03/B/NZ9/04187).

Czy prolaktyna uczestniczy w procesie diapauzy embrionalnej u samic sarny europejskiej?

Does prolactin attend in process of embryonic diapause in females of roe deer?

Korzekwa A.^{1,*}, Zadroga A.¹, Górzyńska I.¹, Bogdaszewski M.², Steiner-Bogdaszewska Ż.²

¹*Zakład Ochrony Bioróżnorodności, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;*

²*Instytut Parazytologii PAN Stacja Badawcza w Kosewie Górnym;*

*a.korzekwa@pan.olsztyn.pl

Ciąża u sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*) może mieć różną długość w zależności od tego czy do zapłodnienia doszło w terminie letnim czy późnojesiennym. Diapauza embrionalna u kóz rozpoczyna się gdy blastocysta traci osłonkę przejrzystą i trwa około pięć miesięcy: do końca grudnia lub początku stycznia. Działanie prolaktyny (PRL) odbywa się za pośrednictwem dwóch rodzajów receptorów — formy długiej (PRLRL) oraz krótkiej (PRLRs). Sugeruje się, że PRLRs blokuje aktywność biologiczną PRL poprzez ograniczenie możliwości wiązania PRL do PRLRL. Celem badań było określenie działania PRL u kóz podczas diapauzy embrionalnej poprzez zbadanie ekspresji receptorów PRL (PRLRL oraz PRLRs) w błonie śluzowej (*endometrium*) oraz stężenia PRL we krwi.

Zwierzęta doświadczalne (n=21) podzielono na trzy grupy w zależności od terminu pozyskania (listopad, grudzień, styczeń). Materiał do badań stanowiły skrawki *endometrium* oraz krew obwodowa pobrane *post mortem* w czasie sezonu polowań (2016/2017) w Nadleśnictwach Maskulińskie i Strzałowo. Na podstawie oznaczeń ekspresji mRNA w *endometrium* i poziomu glikoprotein ciążowych (PAG) oraz stężenia progesteronu we krwi obwodowej stwierdzono, że u wszystkich osobników wystąpiła diapauza. Metodą Real-Time PCR wykonano oznaczenia ekspresji mRNA PRLRL oraz PRLRs w *endometrium*. W osoczu określono stężenia PRL metodą EIA. Wyniki analizowano testem nieparametrycznym Kruskala-Wallisa (One-way ANOVA, GraphPad PRISM7).

Ekspresja mRNA PRLRL w *endometrium* zmniejszyła się od listopada do stycznia ($P < 0,05$). Stosunek ekspresji mRNA PRLRL/PRLRs był najwyższy w listopadzie, a najniższy w styczniu. Stężenie PRL we krwi obwodowej wzrosło od listopada do stycznia ($P < 0,05$).

Wyniki wskazują, że PRL jest zaangażowana w proces diapauzy embrionalnej u samic sarny europejskiej. Mimo wzrostu stężenia PRL we krwi obwodowej, ekspresja PRLRL w *endometrium* zmniejszyła się wraz z przebiegiem diapauzy.

Udział antagonistów receptora progesteronu w regulacji ekspresji mRNA i białka błonowych receptorów progesteronu w błonie śluzowej macicy krowy
Involvement of progesterone receptor antagonists in regulation of mRNA and protein expression of membrane progesterone receptors in the bovine endometrium

Kowalik M.K.*, Rekawiecki R., Krajza K., Kotwica J.

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;

*m.kowalik@pan.olsztyn.pl

Progesteron (P4) wpływa na funkcje komórek macicy przez receptory jądrowe (PGR) oraz błonowe: PGRMC (*progesterone membrane receptor component*) 1 i 2 oraz mPR (*membrane progesterin receptor*) α , β i γ . Wykazano obecność oraz zmienną ekspresję receptorów błonowych P4 w tkankach układu rodnej krowy. Celem obecnych badań było sprawdzenie czy antagoniści PGR (mifepriston-RU486 i onapriston-ZK299) uczestniczą w regulacji ekspresji błonowych receptorów P4 w błonie śluzowej macicy krowy.

Materiałem do badań były skrawki *endometrium*, pobrane od krów/dojrzałych jałówek z 6.-10. oraz 17.-20. dnia cyklu rujowego ($n=4$ /w badanym okresie). Skrawki inkubowano 6 godz. (analiza RNA) i 24 godz. (analiza białka) z: medium kontrolnym, P4, RU486, ZK299 (10^{-4} , 10^{-5} , i 10^{-6} M każdy), oraz AA (20 μ g/ml, kontrola pozytywna). W medium oznaczono stężenie prostaglandyny F2 α i prostaglandyny E2 metodą EIA, a w skrawkach ekspresję mRNA (Real Time PCR) i białek (Western blot) PGRMC1, PGRMC2 i mPR α . Analizę statystyczną wykonano używając jednoczynnikowej analizy wariancji i testu Dunett'a (GraphPad Prism 7.0)

Wykazano, że AA zwiększał stężenie obu prostaglandyn w medium po 6 i 24 godz. Inkubacji w porównaniu do kontroli. P4 (10^{-4} M i 10^{-6} M) hamował ($P<0,01$) ekspresję mRNA *PGRMC1* w 6.-10. dniu cyklu, oraz w dawce 10^{-4} M w dniu 17-20. ZK299 (10^{-5} M i 10^{-6} M) oraz RU486 (10^{-4} M i 10^{-5} M) hamowały ($P<0,05$) ekspresję mRNA *PGRMC1* jedynie w 6.-10. dniu cyklu. Podobnie, P4 (10^{-4} M i 10^{-5} M) obniżał ($P<0,05$) ekspresję mRNA *mPR α* w 6.-10. dniu cyklu. W 17.-20. dniu cyklu, wszystkie dawki P4, ZK299 i RU486 hamowały ($P<0,01$) ekspresję mRNA *mPR α* . Nie wykazano wpływu badanych czynników na poziom ekspresji genu *PGRMC2* w badanych skrawkach. Nie wykazano także wpływu P4 i antagonistów PGR na poziom ekspresji białek badanych receptorów P4.

Uzyskane wyniki wykazały, że P4 oraz antagoniści PGR zmniejszają ekspresję mRNA *PGRMC1* i *mPR α* w skrawkach endometrium macicy krowy w zależności od dawki zastosowanego czynnika oraz fazy cyklu rujowego.

Praca finansowana ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę — Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

Wpływ wybranych czynników na ekspresję błonowych receptorów progestagenów mPR α i mPR β w ludzkich komórkach choriocarcinomy łożyska JEG-3

Effect of selected factors on the expression of membrane progestin receptors mPR α and mPR β in the human placental choriocarcinoma cell line JEG-3

Krajza K.^{*}, Kowalik M.K., Kotwica J.

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;

^{*}k.krajza@pan.olsztyn.pl

Progesteron (P4) wpływa na komórki docelowe na drodze genomowej, przez receptory jądrowe oraz na drodze pozagenomowej, przez receptory błonowe. Obecność błonowych receptorów P4 wykazano także w ludzkich komórkach choriocarcinomy łożyska JEG-3. Komórki tej linii wykazują wiele cech biologicznych identycznych z prawidłowymi komórkami trofoblastu, dlatego też linia komórkowa JEG-3 jest miarodajnym i stosowanym modelem do badań czynności wydzielniczej komórek trofoblastu łożyska oraz udziału receptorów w tych procesach. Dotychczas nie są znane czynniki, które mogą mieć udział w regulacji ekspresji błonowych receptorów P4 w komórkach. Dlatego też, celem niniejszych badań było określenie wpływu: gonadotropiny kosmówkowej (hCG; 10 ng/ml), P4 (10^{-5} M), estradiolu (E2; 10^{-9} M) oraz 5% płynu owodniowego na ekspresję błonowych receptorów mPR (*membrane progestin receptor*) α i β w komórkach choriocarcinomy łożyska JEG-3.

Komórki JEG-3 ($1,2 \times 10^5$ /ml) inkubowano 6 godz. (n=4) i 24 godz. (n=5) z wymienionymi czynnikami. W medium oznaczono stężenie P4 i E2 przy użyciu testu enzymatyczno-immunologicznego (EIA), natomiast w komórkach poziom mRNA mPR α i mPR β za pomocą Real Time PCR. Otrzymane wartości analizowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji dla powtarzających się pomiarów oraz testu Dunnetta.

Wyższe stężenie P4 (P<0,05) wykazano w medium po 6 i 24 godz.; natomiast, pod wpływem stymulacji komórek P4 i płynem owodniowym obserwowano zwiększoną sekrecję E2 (P<0,05) w obu wariantach czasowych. Stwierdzono, że P4 wpływa (P<0,05) na ekspresję mRNA mPR α po 24 godz. inkubacji. Ponadto, wszystkie badane czynniki spowodowały wzrost (P<0,05) ekspresji mRNA mPR β po 24 godz. Nie wykazano wpływu badanych czynników na ekspresję mRNA mPR α i mRNA mPR β po 6 godz. inkubacji.

Uzyskane wyniki sugerują możliwy udział steroidów oraz płynu owodniowego w funkcji wydzielniczej badanych komórek, jak również ich udział w regulacji ekspresji genów mPR α i mPR β w linii komórkowej JEG-3.

Praca finansowana ze środków dotacji KNOW Konsorcjum Naukowego „Zdrowe Zwierzę — Bezpieczna Żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

The effect of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligands on the mRNA expression of Toll-like receptor (TLR-4) and anti-inflammatory cytokines (LIF and IL-10) in porcine endometrium on days 10–12 of pregnancy and the estrous cycle

Udział receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksosomów (PPAR) w regulacji ekspresji mRNA receptora TLR-4 i przeciwzapalnych cytokin (LIF i IL-10) w błonie śluzowej macicy świni w dniach 10–12 ciąży i cyklu rujowego

Kunicka Z.^{*}, Kurzyńska A., Kaczyńska B., Szydlowska A., Grzankowska M., Bogacka I.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

^{*}zuzanna.kunicka@uwm.edu.pl

Cytokines, mediators of the immune response, are involved in the regulation of female reproductive processes during the estrous cycle and pregnancy. Our previous work suggested an interaction between cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in porcine uterus. Thus, the present study aimed to investigate the effect of PPAR selected ligands on the expression of Toll-like receptor (TLR-4) and anti-inflammatory cytokines: leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin (IL)-10 in porcine endometrium on days 10–12 of pregnancy or the estrous cycle.

Endometrial slices were incubated *in vitro* for 6 h in the presence of: PPAR α (agonist WY 14643 and antagonist MK-886); PPAR β (agonist L-165,041 and antagonist GW9662) or PPAR γ [agonists: 15d-prostaglandin J₂ (PGJ₂) or rosiglitazone and antagonist T0070907] ligands. The mRNA level in the tissue was determined by Real Time PCR. The effect of the treatment was determined by one-way analysis of variance for repeated measurements followed by the Duncan *post-hoc* test.

During the estrous cycle, the agonists of all PPAR isoforms enhanced the expression of *LIF* mRNA in porcine endometrium. Moreover, the presence of PPAR β antagonist also increased *LIF* transcript level. The tested factors did not change *TLR-4* and *IL-10* mRNA abundance. During early pregnancy, tested agonists (except rosiglitazone) induced *LIF* mRNA expression, whereas they were ineffective in the regulation of IL-10 synthesis. The expression of *TLR-4* mRNA increased in the presence of PPAR β and PPAR γ agonists.

Our results indicate that different isoforms of PPAR are engaged in endometrial synthesis of *TLR-4* and *LIF* in the pig. While synthesis of *LIF* in the presence of PPAR ligands occurs rather independently on the physiological status of pigs (days 10–12 the estrous cycle *vs.* pregnancy), the enhanced expression of *TLR-4* gene in pregnant sows suggests diverse sensitivity of the tissue to tested factors during the analyzed reproductive stages.

Supported by National Science Centre, Poland, grant no. 2015/17/B/NZ9/03596.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) participate in the synthesis of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) in porcine endometrium on days 10–12 of pregnancy and the estrous cycle

Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów (PPAR) uczestniczą w syntezie jądrowego czynnika Kappa-B (NF- κ B) w błonie śluzowej macicy świni w dniach 10–12 ciąży i cyklu rujowego

Kurzyńska A.*, Kunicka Z., Mierzejewski K., Siejwa P., Bogacka I.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*aleksandra.kurzynska@uwm.edu.pl

Nuclear factor kappa-B (NF- κ B) plays an important role in stimulating inflammation and cell proliferation and also in inhibiting apoptosis in various cell types. It has been reported that the expression of NF- κ B correlates with the synthesis of proinflammatory cytokines. Cytokines are strongly involved in the regulation of reproductive functions. Our study aimed to evaluate whether the expression of NF- κ B mRNA in porcine endometrium varies in the presence of PPAR selected ligands, depending on the reproductive status of sows.

The endometrium was collected from sows on days 10–12 during pregnancy (n=6) or the estrous cycle (n=6). The tissue slices were preincubated and then incubated *in vitro* for 6 h in the presence of: PPAR α [agonist WY 14643 (1 and 10 μ M) and antagonist MK-886 (10 μ M)]; PPAR β [agonist L-165,041 (1 and 10 μ M) and antagonist GW9662 (10 μ M)]; PPAR γ [agonists: 15d-prostaglandin J₂ (10 μ M), rosiglitazone (1 and 10 μ M) and antagonist T0070907 (1 μ M)] ligands. The mRNA level of NF- κ B was determined by Real Time PCR. The effect of the treatment was determined by one-way analysis of variance for repeated measurements followed by the Duncan *post-hoc* test.

During pregnancy, agonists of all PPAR isoforms (- α , - β , - γ) significantly reduced the expression of NF- κ B mRNA in the endometrium. Interestingly, NF- κ B expression was also reduced in the presence of PPAR α or PPAR β antagonists. In the estrous cycle, a decrease in NF- κ B mRNA abundance was noted only in the presence of PPAR β agonist. The remaining factors (PPAR α and PPAR γ ligands) were ineffective.

The obtained results indicate that PPARs are involved in the regulation of NF- κ B gene expression in porcine endometrium. The strong relation between PPARs and NF- κ B during early pregnancy and much weaker during mid-luteal phase of the estrous cycle can be linked to different activity of the local immune system during both analyzed reproductive stages and to diverse sensitivity of the tissue to the tested ligands.

Supported by National Science Centre, Poland, grant no. 2015/17/B/NZ9/03596.

Wpływ chloroorganicznych insektycydów oraz ich metabolitów środowiskowych na syntezę i sekrecję P4, OT i PGF2 α ze skrawków kosmówki gładkiej ciężarnej krowy
The influence of chloroorganic insecticides and their environmental metabolites on P4, OT and PGF2 α synthesis and secretion from smooth chorion slices in the pregnant cow

Młynarczuk J.*, Wojciechowska A., Kotwica J.

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;

*j.mlynarczuk@pan.olsztyn.pl

Badania u zwierząt i ludzi wykazują istotną korelację pomiędzy częstotliwością występowania poronień lub przedwczesnych porodów a ilością DDT, DDE oraz aldryny i dieldryny skumulowanych w tkankach matek. Związki te zwiększają sekrecję oksytocyny (OT) i progesteronu (P4) z ciała żółtego podczas ciąży oraz prostaglandyny F2 α (PGF2 α) z komórek endometrium. Jednocześnie, insektycydy te zwiększają aktywność motoryczną miometrium w cyklu i ciąży. Wraz z rozwojem ciąży rolę ciała żółtego przejmuje kosmówka, która ma także zdolność syntezy PGF2 α i OT. Celem badań było określenie wpływu wymienionych ksenobiotyków na sekrecję P4, OT i PGF2 α oraz ekspresję mRNA enzymów krytycznych dla ich syntezy, tj. *3 β HSD*, *PGA*, *PGFS*, *COX2* oraz genu *NP-I/OT* (koduje białko będące prekursorem OT) w skrawkach kosmówki gładkiej krowy z 5.–6. miesiąca ciąży.

Skrawki blaszki zewnętrznej kosmówki (60–80 mg) inkubowano z ksenobiotykami (1 i 10 ng/ml) przez 24 godz. (w celu oznaczenia ekspresji genów metodą Real-Time PCR) i przez 48 godz. (w celu określenia stężeń hormonów metodą EIA) w Medium-199 z dodatkiem 2% FCS i 10% płynu owodniowego. Wartości średnie (n=8) porównano używając one-way ANOVA i testu Kruskala-Wallisa. Jako różne statystycznie uznawano wartości przy P<0,05.

DDT i DDE zwiększały sekrecję P4, lecz tylko DDE nasilał ekspresję genu *3 β HSD*. DDE (10 ng/ml) stymulował sekrecję OT, przy czym jako jedyny wzmacniał jednocześnie ekspresję genów *NP-I/OT* i *PGA*. DDT i DDE zwiększały sekrecję PGF2 α , podczas gdy aldryna ją hamowała. Jednocześnie, aldryna i dieldryna obniżały ekspresję genu *COX2*. Wzrost ekspresji genu *PGFS* był powodowany przez DDT, DDE (1 ng/ml) oraz dieldrynę (10 ng/ml).

Uzyskane wyniki wskazują, że użyte ksenobiotyki mogą zwiększać syntezę i sekrecję OT i/lub PGF2 α z kosmówki, przez co wywoływać efekt luteolityczny, i/lub wpływać na wzrost aktywności motorycznej mięśniówki macicy, a tym samym zwiększać ryzyko wystąpienia poronień lub przedwczesnych porodów.

Praca wykonana w ramach Grantu NCN 2013/11/B/NZ4/04745.

Actin and its binding proteins are involved in endometrial epithelial remodeling during early porcine pregnancy

Aktyna i wiążące ją białka biorą udział w procesie przebudowy nabłonka błony śluzowej macicy świni podczas wczesnej ciąży

Moza Jalali B.*, Likso P., Skarżyński D.J.

Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Science, Olsztyn;

*beenu.jalali@pan.olsztyn.pl

Mammalian endometrium undergoes extensive structural remodeling in order to accommodate and support rapid conceptus development and growth. As a result of remodeling, changes in cytoskeletal elements are expected but molecular changes associated with structural organizations in porcine endometrium are not known. Aim of the study was to investigate which of the actin-binding proteins (ABPs) are involved in cytoskeletal reorganization during the period of early porcine pregnancy.

To address our aim, gene and protein expression of ABPs — gelsolin (GSN), cofilin (CFL), vinculin (VCL) and annexin A2 (*Anxa2*) was evaluated using qPCR and Western blotting; respectively, in the porcine endometrium collected on days 10, 13 and 16 of estrous cycle and pregnancy. Results were analyzed using one-way ANOVA. Double immunofluorescent staining of actin and its binding proteins was employed to evaluate their co-localization.

There was no change in endometrial gene expression of *GSN* and *VCL* in the studied group of animals. Expression of *Anxa2* and *CFL* increased on day 13 of pregnancy as compared to day 13 of cycle ($P < 0.05$). The results of Western blot analysis revealed an increase in *GSN* and *VCL* expression between days 10 and 13 of cycle. *VCL* further increased between days 13 and 16 of pregnancy ($P < 0.05$). Expression of *CFL* decreased from day 10 to day 13 of the estrous cycle; however, presence of conceptuses increased *CFL* expression on day 13 and 16 of pregnancy as compared to corresponding days of cycle. *VCL* and *GSN* were observed to co-localize with β -actin in the apical epithelium on days 13 and 16 of pregnancy. *CFL* co-localized with actin only in sub-epithelial stroma. *Anxa2* was seen in apical epithelium only on days 10 and 16 of cycle and did not seem to co-localize with actin.

In summary, our results indicate that ABPs such as *GSN* and *VCL* might be associated with rearrangement of actin cytoskeleton during porcine reproductive cycle.

This study was supported by an internal grant from IAR&FR PAS, Olsztyn.

Identyfikacja sposobów transportu miRNA w matczynej surowicy krwi podczas wczesnej ciąży u świni

Identification of possible routes of miRNA transport in maternal serum during early pregnancy in pigs

Reliszko Ż.R.¹, Gajewski Z.², Kaczmarek M.M.^{1,2,*}

¹*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;*

²*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa;*

*m.kaczmarek@pan.olsztyn.pl

Wczesna ciąża u świni to okres intensywnej wymiany sygnałów między zarodkiem a matką, wymagający obecności wielu czynników, w tym hormonów, czynników wzrostu i cytokin. Ekspresja wymienionych biomolekuł regulowana jest już na poziomie transkrypcji, aczkolwiek ogromne zainteresowanie budzą obecnie regulacje potranskrypcyjne z udziałem niewielkich, niekodujących cząsteczek mikroRNA (miRNA). Nasze dotychczasowe badania potwierdziły obecności miRNA w zarodkach, trofoblastach i tkankach układu rozrodczego świni, a niektóre z tych cząsteczek wykryto również w matczynej surowicy krwi podczas ciąży. Istnieją liczne sposoby transportu miRNA w surowicy, m.in. mogą być one związane z białkami transportującymi (np. z rodziny Argonaute, Ago2) lub/i stanowić ładunek pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV). Celem niniejszych badań było określenie możliwych sposobów transportu miRNA w surowicy krwi podczas wczesnej ciąży u świni.

Materiał do badań stanowiła surowica krwi pobrana od loszek będących w 16. dniu ciąży (DC, n=3), z której następnie izolowano EV podczas ultrawirowania. Materiał wyjściowy poddano również immunoprecypitacji w obecności przeciwciał rozpoznających epitopy Ago2 (surowica) oraz CD9 i CD63 (osad EV), tetraspanin, będących markerami EV.

Metodą Western blot wykazano obecność białka Ago2 w surowicy świni w 16 DC. Natomiast, EV w surowicy obserwowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. W polu widzenia wykazano obecność nielicznych struktur odpowiadających egzosomom o wielkości ok. 100 nm. Jednak, metodą Western blot nie udało się wykryć ekspresji białek CD9 i CD63 w osadzie EV. Prawdopodobną przyczyną jest niespecyficzność przeciwciał oraz zbyt mała czułość zastosowanej metody.

Podsumowując, słuszne wydaje się stwierdzenie, że podczas ciąży miRNA mogą być transportowane z udziałem białek transportujących oraz pęcherzyków. Niezbędne są dalsze badania potwierdzające obecność wybranych miRNA związanych z Ago2, bądź upakowanych w EV.

Praca finansowana z Dotacji Statutowej IRZiB PAN w Olsztynie.

The effect of orexin A on *StAR*, *HSD3B1* and *CYP11A1* gene expression and on progesterone and androstenedione secretion by porcine uterus during early pregnancy

Wpływ oreksyny A na ekspresję genów *StAR*, *HSD3B1* i *CYP11A1* oraz na sekrecję progesteronu i androstendionu przez macicę świń w okresie wczesnej ciąży

Rytelewska E.*, Kisielewska K., Dobrzyń K., Kieżun M., Szeszko K., Kamiński T., Smolińska N.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*edyta.rytelewska@wp.pl

Our earlier studies indicated the involvement of orexin A (OXA) in ovarian steroidogenesis in pigs. It is conceivable that OXA affects also uterine steroidogenesis. Therefore, the aim of this study was to investigate OXA effect (1, 10, 100 nM) on progesterone (P_4) and androstenedione (A_4) secretion and gene expression of the key steroidogenic enzymes: steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (*HSD3B1*) and P450 side chain cleavage enzyme (*CYP11A1*).

Endometrial and myometrial tissue explants were collected from gilts on days 10 to 11 (migration of the embryos) and 12 to 13 (maternal recognition of pregnancy) of gestation. Gene expression was evaluated by real-time PCR, and the secretion of steroids was analyzed by RIA. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Fisher's least significant difference *post hoc* test.

During both studied periods of early pregnancy, OXA inhibited endometrial expression of *StAR* and *HSD3B1* mRNAs. *CYP11A1* mRNA content was increased in response to OXA on days 10 to 11 and suppressed on days 12 to 13. In myometrial slices isolated on days 10 to 11, OXA inhibited *StAR* and *HSD3B1* expression and enhanced *CYP11A1* mRNA concentration. On days 12 to 13, *StAR* expression was enhanced by OXA of lower and decreased at higher doses used. The effect of OXA on *CYP11A1* expression was stimulatory at higher and inhibitory at lower concentrations, respectively. In the endometrium, OXA stimulated P_4 secretion on days 10 to 11 and 12 to 13, and inhibited A_4 secretion on days 10 to 11. In the myometrium, OXA stimulated P_4 secretion on days 10 to 11.

Our research suggests that OXA may participate in the control of key steroidogenic enzymes gene expression and P_4 and A_4 secretion during early pregnancy.

This research was supported by National Science Centre (project no: 2011/03/B/NZ9/04187).

Effect of adiponectin on PGE₂ and PGF_{2α} release and COX2, CBR1, mPGES-1 and PGFS gene expression in porcine endometrium during peri-implantation period
Wpływ adiponektyny na uwalnianie PGE₂ i PGF_{2α} oraz ekspresję genów COX2, CBR1, mPGES-1 i PGFS w endometrium świni w okresie okołoimplantacyjnym

Smolińska N.^{*}, Kieżun M., Szeszko K., Dobrzyń K., Rytelska E., Kisielewska K., Kamiński T.

*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*nina.smolinska@uwm.edu.pl

It is believed that adiponectin, hormone which controls energy homeostasis, belongs to the group of hormones regulating metabolic status and reproduction. Our previous results demonstrated the presence of adiponectin system in porcine uterus during early pregnancy. We hypothesized that adiponectin modulates the release of prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), hormones engaged in conceptus implantation and gene expression of key enzymes of prostaglandins (PGs) synthesis: cyclooxygenase-2 (COX2), prostaglandin 9-ketoreductase (CBR1), PGE synthase (mPGES-1) and PGF synthase (PGFS) in porcine endometrium.

Endometrial explants harvested from gilts on days 15 to 16 (implantation) and 27 to 28 (end of implantation) of pregnancy were cultured *in vitro* in the presence of adiponectin (1, 10 µg/ml). PGs secretion was determined using an ELISA test. Gene expression was examined by real-time PCR. Data were analysed based on one-way ANOVA and LSD *post hoc* test.

In endometrial explants collected on days 15 to 16 of pregnancy, the release of PGE₂ was decreased in response to 1 µg/ml of adiponectin, and increased under influence of a higher dose of hormone. Secretion of PGF_{2α} was suppressed by adiponectin (10 µg/ml) during implantation. On days 27 to 28 of pregnancy, both doses of adiponectin increased PGE₂ release, and at a higher dose decreased PGF_{2α} secretion. During implantation, adiponectin at a higher dose decreased COX2 expression. Adiponectin at a lower dose suppressed, whereas at a higher dose increased CBR1 and PGFS mRNA content on days 15 to 16. At the end of implantation, adiponectin (10 µg/ml) stimulated CBR1 and mPGES-1 expression.

Our novel findings indicate that adiponectin modulates the release of PGs and gene expression of enzymes essential for PGs production in porcine endometrium during implantation, suggesting that adiponectin may play an important role in this process.

This research was supported by National Science Centre (project no: 2011/03/B/NZ9/04187).

Analiza porównawcza proteomu osocza suk ciężarnych i nie-ciężarnych **Comparative analysis of plasma proteome in pregnant and non-pregnant female dogs**

Szczubiał M.^{1,*}, Wawrzykowski J.², Dąbrowski R.¹, Krawczyk M.¹, Kankofer M.²

¹*Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin;*

²*Katedra Biochemii, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin;*

*marek.szczubial@up.lublin.pl

Zastosowanie technik proteomicznych pozwala na precyzyjną analizę profili białkowych w płynach ustrojowych i tkankach ludzi i zwierząt. Badanie profili białkowych w przebiegu procesów fizjologicznych, takich jak ciąża, stwarza nowe możliwości określenia białek bezpośrednio zaangażowanych w te procesy, co pozwoli na dokładniejsze poznanie tych procesów. Analiza proteomu ciężarnych samic daje możliwość identyfikacji nowych markerów białkowych ułatwiających wczesną diagnostykę ciąży oraz wykrywanie zaburzeń w jej przebiegu. Celem badań było porównanie profili białkowych osocza suk ciężarnych i suk nie-ciężarnych będących w fazie *diestrus* cyklu rujowego.

Materiał do badań stanowiły próbki osocza od 4 suk ciężarnych (uzyskane w I, II i III trymestrze ciąży oraz 3 dni po porodzie) i od 4 suk nie-ciężarnych będących w fazie *diestrus* cyklu rujowego. Analizę profilu białkowego osocza badanych suk wykonano przy użyciu dwuwymiarowej fluorescencyjnej elektroforezy różnicowej (2D-DIGE) oraz spektrometrii mas (MALDI TOF MS). Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Delta2D (Decodon GmbH, BioTechnikum Greifswald, Germany).

Analiza porównawcza proteomów osocza suk w ciąży i suk będących w ciąży wykazała 35 białkowych spotów, których intensywność wybarwienia różniła się istotnie między badanymi grupami zwierząt. Zastosowanie spektrometrii mas w celu analizy tych spotów pozwoliło zidentyfikować 5 białek (białko 5 zawierające domenę BED palca cynkowego, podjednostka β -2 hemoglobiny, podjednostka 7 kompleksu integratora, apolipoproteina A-I, aminopeptydaza glutamylowa).

Przeprowadzone badania wskazują, że profil białkowy osocza suk ciężarnych różni się od profilu białkowego suk nie-ciężarnych, co sugeruje, że białka wykazujące podczas ciąży zmienioną ekspresję mogą odgrywać istotną rolę w utrzymaniu ciąży.

**The influence of adiponectin on gene expression of *StAR*,
GFPT1 and *IRF1* in the porcine myometrium on days 15–16 of pregnancy**
**Wpływ adiponektyny na ekspresję genów *StAR*, *GFPT1* oraz *IRF1* w miometrium świni
w 15–16 dniu ciąży**

Szeszko K.*, Smolińska N., Dobrzyń K., Kieżun M., Rytelska E., Kisielewska K., Kamiński T.

Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;

*karol.szeszko@uwm.edu.pl

Female reproductive functions are closely associated with nutritional status. Adiponectin seems to be an important factor linking the regulation of metabolic homeostasis and reproductive processes. The aim of this study was to determine the most potent genes connected to the female reproductive functions in the porcine myometrium on days 15–16 of gestation (beginning of implantation), which expression is regulated by adiponectin.

The tissue samples were harvested on days 15 to 16 of gestation. Tissue slices were incubated with 10 µg/ml of adiponectin or without treatments (control) for 24 hours. Total RNA isolated from the cells after culture was assigned for microarray analysis and real-time PCR validation of microarray results. The global expression of genes was investigated using the Porcine (V2) Two-color gene expression microarray, 4x44. In order to confirm microarray results three genes: *StAR* (steroidogenic acute regulatory protein), *GFPT1* (glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1) and *IRF1* (interferon regulatory factor 1) were validated by qPCR. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by LSD *post hoc* test.

StAR is a transport protein that regulates cholesterol transfer within the mitochondria, which is the rate-limiting step in the production of steroid hormones. In this study, we noted up-regulation of *StAR* caused by adiponectin treatment. The main role in glucose metabolism may be played by *GFPT1*, which is the first and rate-limiting enzyme of the hexosamine pathway. *GFPT1* controls the flux of glucose into the hexosamine pathway and catalyzes the formation of glucosamine 6-phosphate. *IRF1* plays roles in the immune response, regulating apoptosis, DNA damage and tumor suppression. We observed down-regulatory effect of adiponectin on *GFPT1* and *IRF1* gene expression.

In conclusion, the obtained data seems to confirm our hypothesis of the important role of adiponectin in the regulation of the porcine myometrium during early pregnancy.

This research was supported by National Science Centre in Poland (project no: 2011/03/B/NZ9/04187).

Immunolocalization and mRNA expression of AQP1 and 5 in the pig uterine cells during luteal phase

Immunolokalizacja oraz ekspresja mRNA AQP1 i AQP5 w komórkach macicy świni w czasie fazy lutealnej

Tański D.^{1,*}, Młotkowska P.¹, Skowrońska A.², Skowroński M.T.¹

¹*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

²*Department of Human Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;*

*damian.tanski@uwm.edu.pl

Aquaporins (AQPs) regulate cellular water transport and cell volume and play a key role in water homeostasis in reproductive system. Recently, we demonstrated that AQP1 and 5 are regulated by steroid hormones and arachidonic acid (AA) in the porcine uterus during the estrous cycle. This study has examined the effect of progesterone (P₄), estradiol (E₂), oxytocin (OT) and arachidonic acid (AA) on *Aqp1* and 5 expression in epithelial cells of the endometrium (EP) and myometrial cells (ME) of the porcine uterus.

Tissue samples were recovered from mature gilts at the mid (Days 10–12) and late luteal phase (Days 14–16) of the estrous cycle. *In vitro* cell cultures were stimulated for 3 h and 24 h with P₄, E₂, OT and AA. Gene and protein expression of examined AQPs in the uterine epithelial and myometrial cells was evaluated by real-time PCR and immunofluorescence, respectively. All numerical data were analyzed by one-way ANOVA and least significant difference (LSD) *post hoc* test.

In the present study, we observed decreased expression of *Aqp1* in EP after 3 and 24 h of incubation with examined factors on Days 10–12 in relation to control. In ME, only OT induced *Aqp1* expression in short incubation; however, longer treatment with all studied factors increased *Aqp1* mRNA expression. During luteolysis, treatment of EP cells with P₄, OT and AA for 24h increased *Aqp1* mRNA expression, while in ME cells *Aqp1* expression was stimulated by E₂, OT and AA. During the mid-luteal phase P₄ and AA stimulated *Aqp5* mRNA expression in EP after 3 h of incubation. In turn, during luteolysis E₂ increased *Aqp5* expression after longer incubation. Treatment of ME from Days 10–12 with P₄, E₂, OT and AA significantly increased *Aqp5* mRNA expression. Similar effect was observed in ME from Days 14–16 except for P₄ and OT. Our results also showed the subcellular distribution of AQP5 protein in EP cells.

We showed for the first time the expression profiles of the *Aqp1* and *Aqp5* in the porcine uterine cells. These results suggest that examined factors may mediate the action of AQP1 and 5 in uterine cells during the luteal phase of the cycle.

Supported by National Science Centre UMO-2013/09/B/NZ9/03129.

The expression of pluripotency markers in the porcine myometrium
Ekspresja markerów pluripotencji w miometrium świni

Waszkiewicz E.*, Zglejc K., Martyniak M., Franczak A.

Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn;

*ewa.waszkiewicz@uwm.edu.pl

Myometrium possesses high potential to proliferate and differentiate, which is crucial for structural adaptations of this tissue during the estrous cycle and pregnancy. The potential is considered to be due to the action of side population cells that exhibit the characteristics of stem cells including the expression of pluripotency markers. Side population cells were identified in the uteri of women, cows and mice, but there is still little known whether they are present in porcine myometrium. Therefore, the aim of this study was to determine the expression of selected pluripotency markers, *i.e.*, OCT 3/4, TRA 1-60, Sox-2 and c-Kit in the porcine myometrium.

The study was conducted on the myometrial slices obtained from post-pubertal pigs on days 12-13 of the estrous cycle (n=5). The gene expression analysis was performed using Real-Time PCR with SYBR Green and specific primers for OCT 3/4, TRA 1-60, Sox-2 and c-Kit. The relative expression of the studied genes was calculated using $\Delta\Delta C_t$ method with the mean of the reference genes expression, *i.e.*, ACTB and RNA 18S. The OCT 3/4, TRA 1-60, Sox-2 and c-Kit protein abundance were determined with immunofluorescence. The obtained results were analyzed using one-way ANOVA with Tuckey's *post-hoc* test.

Porcine myometrium exhibits the expression of all studied markers of pluripotency on both the gene and protein level. The expression of mRNAs did not differ between studied markers. However, statistically significant differences in protein abundance was found. Specifically, the abundance of Sox-2 protein was the highest and the abundance of OCT 3/4 was the lowest among the studied markers.

In conclusion, the porcine myometrium appears to contain side population cells, which exhibit the characteristics of stem cells. Therefore, the tissue may be considered as an interesting source of these cells which might be used for further research, including isolation, insightful characterization and potential usage in biomedical research.

Supported by grant UWM 12.650.012-300.

Wpływ antagonisty receptorów leukotrienowych na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej macicy świń podczas fazy lutealnej cyklu rujowego i w okresie wczesnej ciąży

Influence of leukotriene receptor antagonist on contractile activity of the porcine uterine smooth muscle during the luteal phase and early pregnancy

Wiśniewska A., Jaroszewski J.J., Markiewicz W.*

*Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn;*

*mark@uwm.edu.pl

Obecność receptorów leukotrienowych stwierdzono w macicy ludzi, bydła, koni i świń. W badaniach *in vitro* wykazano, że leukotrieny C_4 i D_4 zwiększają aktywność skurczową zapalnie zmienionej macicy świni w fazie lutealnej cyklu rujowego. Kurczliwość macicy świni pomiędzy 12. a 14. dniem ciąży ma kluczowe znaczenie dla pomyślnej implantacji, jednakże brak jest danych na temat roli leukotrienów w tym zakresie. Dlatego celem badań było porównanie wpływu montelukastu, antagonisty receptorów leukotrienowych, na kurczliwość mięśniówki gładkiej macicy świni w dniach 12.-14. cyklu rujowego i ciąży.

Badania przeprowadzono na niedojrzałych płciowo loszkach ($n=16$), które poddano procedurze indukcji rui podając domięśniowo 750 I.U. eCG i po 72 godz. 500 I.U. hCG. Po 13–16 dniach od podania hCG wykonywano iniekcję domięśniową dinoprostu (analogu $PGF_{2\alpha}$) i po 24 godz. ponownie podawano eCG oraz po 72 godz. hCG. Po 24 godz. od podania hCG osiem loszek inseminowano dwukrotnie w odstępach 12 godz. Zwierzęta ubijano w 12.-14. dniu cyklu ($n=8$) lub ciąży ($n=8$) i pobierano wycinki macicy do badań aktywności skurczowej mięśniówki gładkiej z wykorzystaniem zestawu do pomiaru skurczów izometrycznych Hugo Sachs Elektronik. Skrawki miometrium (3 x 5 mm) zawieszano w naczynkach inkubacyjnych zawierających 5 ml płynu Krebsa-Ringera o temp. 37 °C, wysycanego karbogenem i po 60–90 min. preinkubacji stymulowano wzrastającymi (10^{-8} – 10^{-4} M) stężeniami montelukastu. Do wykazania różnic istotnie statystycznych pomiędzy grupami zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA wykorzystując test *t*-Studenta z progiem istotności $P<0,05$.

Wykazano, że montelukast nie wpływał istotnie na napięcie i częstotliwość skurczów, ale w stężeniach 10^{-7} – 10^{-5} M ($P<0,05$) i 10^{-4} M ($P<0,001$) powodował zmniejszenie amplitudy skurczów w skrawkach macicy pobranych od świń w cyklu rujowym. Z kolei, w miometrium pobranym od świń we wczesnej ciąży montelukast stosowany w stężeniach 10^{-6} – 10^{-4} M powodował wzrost napięcia ($P<0,001$) oraz zmniejszenie częstotliwości skurczów w stężeniach 10^{-7} M ($P<0,01$) i 10^{-6} – 10^{-4} M ($P<0,001$) oraz amplitudy skurczów w stężeniach 10^{-7} – 10^{-4} M ($P<0,001$).

Uzyskane wyniki wskazują, że miometrium świni we wczesnej ciąży jest bardziej wrażliwe na działanie montelukastu, niż w fazie lutealnej cyklu rujowego.

Wpływ czynników o aktywności endokrynej (EAC) na rozwój endometrium i adenogenezę u neonatalnej świni

Effect of endocrine active compounds (EACs) on endometrial development and adenogenesis in the neonatal pig

Czaja E.*, Knapczyk-Stwora K., Ślomczyńska M.

Department of Endocrinology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Krakow;

*ela.czaja@doctoral.uj.edu.pl

U wielu gatunków ssaków, w tym u świń, nie obserwuje się występowania gruczołów w endometrium w dniu urodzenia. Ich tworzenie rozpoczyna się w pierwszym tygodniu życia postnatalnego (PND 0–7). Następny okres (PND 7–14) charakteryzuje się maksymalną syntezą DNA obserwowaną w nabłonku gruczolowym. Celem badań było określenie wpływu związków wykazujących aktywność endokrynną (EAC; *endocrine active compounds*) na rozwój endometrium, a w szczególności na zachodzące procesy adenogenezy. Wpływ EAC zastosowanego w okresie od urodzenia do 10. dnia życia przedstawiono stosując analizę morfologiczną i określając tempo proliferacji.

Neonatalnym świniom podawano domięśniowo propionian testosteronu (TP), flutamid (Flu), 4-tert-oktylfenol (OP), ICI 182,780 (ICI) i metoksychlor (MXC) codziennie pomiędzy 1. a 10. dniem po urodzeniu (n=4 na każdą grupę). Macice neonatalnych świń uzyskiwane zostały w dniu 11. i utrwalane w odczynniku Bouina do badań morfologicznych i immunohistochemicznych. Ocena histologiczna została przeprowadzona przy zastosowaniu barwienia hematoksyliną i eozyną. Grubość endometrium była mierzona przy użyciu kalibrowanego okularu i określana jako odległość (μm) od błony podstawnej nabłonka luminalnego (LE) do granicy ze stromą endometrium. Proliferacja w neonatalnych macicach została określona przez analizę antygenu jądrowego komórek proliferujących (PCNA) metodą immunohistochemiczną. Otrzymane wyniki zostały przeanalizowane przy zastosowaniu testu U Mann-Whitney’a.

Analiza danych pokazuje wyraźny wpływ OP i TP na zahamowanie procesu tworzenia się gruczołów w endometrium. Zastosowane w doświadczeniu EDC miały wpływ na obserwowane różnice w grubości endometrium.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że egzogenne stosowane związki mające aktywność endokrynną wywierają istotny wpływ na rozwój i funkcjonowanie żeńskiego układu rozrodczego.

Materiał do badań pozyskano w ramach projektu NCN 2015/17/B/NZ9/01457 (dla MS). Finansowany przez K/ZDS/006308.

Reproductive behavior and fertility of ganders in relation to age and position in social hierarchic rank

Behawior reprodukcyjny i płodność gęsiorów w zależności od wieku oraz pozycji w hierarchii socjalnej

Gumulka M.^{1,*}, Rozenboim I.²

¹University of Agriculture in Krakow, Krakow, Poland;

²The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel;

*m.gumulka@ur.krakow.pl

The objective of the study was to (1) investigate the effects of ganders' age on fertility and mating activity (MA) parameters in a flock of domestic geese managed in the conditions of competitive mating social structure and (2) characterize gander–goose sexual behavior in relation to the position of ganders in social hierarchic rank.

The study was carried out on one-year-old geese (n=64) and one or two-year-old ganders (n=16; 1 ♂: 4 ♀). Observations of MA were conducted during the 3-h period of the daylight (10 h), 2–3 times per week (102 h/group/34 days). The recording was done with a digital recorder connected to cameras. Agonistic behavioral interactions between ganders were noted to determine a social hierarchic rank. The MA was described by frequency of courtship displays, copulation attempts, successful copulation (SCop), and interaction disrupted (DMI) with agonistic behavior. Total plasma T concentration was measured by radioimmunoassay procedure. Fertility (F) was evaluated after the artificial incubation (1×/week) in a commercial hatchery. The differences between means for ganders' age group were evaluated using Student's *t*-test. For the social hierarchy rank effect the Tukey-Kramer was used as *post-hoc* test for multiple comparisons.

The frequency of SCop, DMI, and T concentration were higher for two than one-year-old ganders. Moreover, F was higher by 11.2% for group of geese kept with two-year-old ganders. There was an effect of the gander's rank in social hierarchy on the frequency of MA. For dominant ganders, frequency of courtship displays (1.0/times/3 h) and copulation attempts (0.8/times/3 h) were lower, but SCop (1.5/times/3 h) was higher than for subordinate ones.

Thus, in domestic goose flocks reproductive success was associated with age of ganders used in competitive mating system. This is probably a multifactor effect of interaction between sexual/social experience, T-dependent mating motivation, and efficiency of MA. It is recommended to keep one-year-old geese with older ganders (after sexual reactivation) for optimal fertility results with sex ratio adjusted to gander–gander antagonistic interaction dynamic.

Supported by statutory activity, DS no.3264.

Ekspresja prepro-oreksyny i receptorów oreksyn w nadnerczach świni domowej (*Sus scrofa domestica*) w fazie lutealnej i pęcherzykowej cyklu rujowego

The expression of prepro-orexin and orexin receptors in the adrenals of the pig (*Sus scrofa domestica*) during luteal and follicular phase of the oestrus cycle

Kamińska B.*, Smolińska N., Bogacka I., Siawrys G., Kamiński T.

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

*barbara.kaminska@uwm.edu.pl

Mechanizmy kontroli homeostazy energetycznej i funkcjonowania układu rozrodczego są ściśle zintegrowane. Zbadany jest np. wpływ hormonów regulujących pobieranie pokarmu zarówno na status metaboliczny, jak i funkcje rozrodcze. Z drugiej strony, ważne jest powiązanie tych hormonów z funkcjami kory nadnerczy, gdyż glikokortykoidy są zaangażowane w kontrolę homeostazy energetycznej, pobieranie pokarmu i procesy rozrodu. Oreksyny (OXs), neurohormony powstające w centralnych układzie nerwowym i w wielu tkankach obwodowych, biorą udział w wywoływaniu zachowań pokarmowych, regulacji stanu pobudzenia i snu oraz sprawują kontrolę nad energetyczną homeostazą organizmu. Oreksyny A (OXA) i B (OXB) powstają z peptydowego prekursora — prepro-oreksyny (PPO). OXs działają za pośrednictwem receptorów (OXRs): OXR1 i OXR2. Ligandem OXR1 jest OXA, natomiast OXR2 wiąże oba peptydy. Badania dotyczące ekspresji genów kodujących PPO i OXRs w nadnerczach i związku tego zjawiska ze statusem hormonalnym zwierząt są nieliczne a wyniki niejednoznaczne. Zatem sformułowano hipotezę zakładającą, że w korze nadnerczy świni zachodzi ekspresja genów i białek PPO oraz OXRs i jest ona zmienna w cyklu rujowym.

Badania przeprowadzono na nadnerczach dojrzałych płciowo loszek w fazie lutealnej (10.-12. dzień) i pęcherzykowej (17.-19. dzień) cyklu rujowego. Ekspresję genów i białek PPO, OXR1 i OXR2 określono przy pomocy PCR oraz Western blot. Wyniki poddano analizie wariancji jednoczynnikowej, zakończonej testem NIR.

W korze nadnerczy świni stwierdzono ekspresję genów kodujących PPO, OXR1 i OXR2. Ekspresja tych genów była wyższa w fazie pęcherzykowej niż lutealnej cyklu rujowego. Również w przypadku białka OXR2 zaobserwowano wzrost koncentracji w fazie pęcherzykowej. Z kolei, stężenie białka PPO i OXR1 było wyższe w fazie lutealnej.

Uzyskane wyniki wskazują na związki między funkcjonowaniem układu rozrodczego, kory nadnerczy i hormonami regulującymi apetyt.

Praca finansowana ze środków UWM 12.610.005–300.

The influence of the length of the catheter introduced into the cisterna magna and fourth ventricle of the sheep's brain on the cerebrospinal fluid collection

Wpływ długości cewnika dordzeniowego wprowadzanego do zbiornika mózdkowo-rdzeniowego oraz komory czwartej mózgowia u owiec na efektywność pobierania płynu mózgowo-rdzeniowego

Kirsz K.^{1,*}, Bocheńska A.², Pietsch-Fulbiszewska A.², Sowińska N.², Kabała N.², Borsuk A.¹, Biernat W.¹

¹Laboratory of Biotechnology and Genomics, Department of Animal Biotechnology,
Agricultural University of Krakow, Krakow;

²Center for Experimental and Innovative Medicine, University for Veterinary Medicine UJ-UR, Krakow;

*k.kirsz@ur.krakow.pl

Drugs infusion through a catheter into the cisterna magna (CM) and repeated sampling of the cerebrospinal fluid (CSF) allow to determine the impact of chemicals on the central nervous system without passing drugs through the peripheral circulation and blood-brain barrier. The aim of the study was to develop an effective, reproducible and minimally invasive method of collecting CSF.

In order to guide the catheter, sheep underwent general anesthesia. Animal was placed on the right lateral recumbency. Puncture site was determined by median line and intracranial-dorsal edge of the atlas' wings, caudally to the external occipital protuberance, at the angle of 75–80 degrees, nasally, towards the CM. The guide-needle was inserted into the mid-length. When the CSF appeared, the catheter (Uniever combined epidural anesthesia minitray, 90 mm, 18G, longer than 15 cm in group A and shorter than 15 cm in group B) was introduced into the atlanto-occipital space, and then the needle was removed. The control of the catheter position was carried out by means of computed tomography. In the bone window, in sagittal cross-section in the multiplanar reconstructions, the portion of the catheter was visualized in the cerebrospinal reservoir. Catheter was sutured to the skin and secured, so CSF could be collected after 24 h. The efficiency of such method was confirmed during a 6-hour CSF (500 µl) collection; every 15 minutes. Data were analyzed using *Chi-Squared test*.

Significant difference ($P < 0.05$) in CSF collection efficiency by use of different length of the catheters was observed. The CSF was successfully collected in 62.5% (5/8) of group A (long catheters > 15 cm) and 14.3% (1/7) in group B (short catheters ≤ 15 cm).

The method of inserting catheters of more than 15 cm into the atlanto-occipital space was more effective for CSF sampling and assessing the pharmacological effects and mechanism of the central action of drugs on the nervous system in sheep.

Research supported by DS3242/16.

**Identification of pregnancy-associated glycoprotein-like gene family (*PAG-L*)
in genome of Tarbagan marmot (*Marmota sibirica*)**

**Identyfikacja rodziny glikoprotein ciążowych PAG (pregnancy-associated
glycoprotein) w genomie świstaka syberyjskiego (*Marmota sibirica*)**

Panasiewicz G.^{1,*}, Sakowicz J.¹, Bieniek-Kobuszewska M.², Lipka A.¹, Saveljev A.P.³, Gizejewski Z.⁴,
Szafranska B.¹

¹Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland;

²Department of Dermatology, Sexually Transmitted Diseases and Clinical Immunology, Faculty of Medical
Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland;

³Department of Animal Ecology, Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming,
Kirov, Russian Federation;

⁴Department of Biodiversity Protection, Institute of Animal Reproduction and Food Research,
Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland;

*panasg@uwm.edu.pl

Aspartic proteinase superfamily (AP) includes various proteins present in vertebrates and non-vertebrates, e.g., pepsin A, C, F, cathepsin D, renin, PAG-L and several fungal and retroviral enzymes. Among ungulate mammals (Artiodactyla and Perissodactyla orders), multiple complementary DNAs (cDNAs) of placentally-expressed PAG gene families have only been cloned in a few wild species (zebra, white-tailed deer, water buffalo and American bison). Only single PAG cDNAs have been identified in the mouse and beaver (*Rodentia*). In contrast, genomic DNA (gDNA) sequences of the PAG (promoters and 9 exons/8 introns) have been identified in domestic cattle and pig only. The aim of this study was to identify sequences of the PAG-L in the genome of the Tarbagan marmot.

Genomic DNA (gDNA) templates (N=9) isolated from dried (n=8) and ethanol-preserved (n=1) skins of adult marmots (7 females and 2 males), were used for PCR amplification of the PAG-L with a few heterologous exonic primers that should amplify entire regions of exons 1–9 with introns A–H, according to the porcine PAG gDNA or cDNA, as positive control templates. Dominant marmot gDNA amplicons (~300–1300 bp) were electrophoretically separated, UV-visualized, gel-out purified, precipitated and sequenced in sense and antisense directions.

Sequenced amplicons (100–750 nt) permitted to identify a fragment of the marmot PAG-L gene, named *MsPAG-L*, according to Latin nomenclature of this species (*Marmota sibirica*). All identified *MsPAG-L* sequences revealed high homology (~75%) to porcine PAG2 subfamily. In addition, single nucleotide polymorphism (SNP) was identified in the *MsPAG* gene fragments.

This is the first report describing a pioneer nucleotide sequence identification of the *MsPAG-L* gene fragments. Our results provide a novel database for the Tarbagan marmot genome, representing wild *Rodentia* species.

Supported by UWM12.610.005–300

Expression profile of suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) transcripts at selected stages of fetal development in lambs

Profil ekspresji transkryptów supresorów sygnalizacji cytokinowej-3 (SOCS-3) w tkankach jagniąt na wybranych etapach rozwoju płodowego

Szczesna M.^{*}, Kirsz K., Wawrzyn A., Zięba D.

*Department of Animal Biotechnology, Faculty of Animal Sciences,
University of Agriculture in Krakow, Krakow;*

^{*}m.szczesna@ur.krakow.pl

Suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS-3) are important negative regulators of the JAK/STAT signaling pathway. Expression of SOCS-3 depends on the activity of various cytokines and hormones and plays a significant role in tissue-specific regulation of growth and proliferation of cells, both before and after birth. The aim of this study was to assess SOCS-3 mRNA expression in selected tissues of lambs during fetal development.

Fetuses were obtained from 9 Polish Longwool ewes euthanized at 60, 90, and 120 days of pregnancy (3 animals per time-point). Ewes were mated after estrus synchronization and had twin pregnancies. Triplicates of tissues samples (from liver, lungs, kidneys, heart, brain and anterior pituitary) were collected from six fetuses at each stage of pregnancy. Real-time PCR was used to measure tissue-specific SOCS-3 mRNA expression. Expression levels were calculated using a relative quantification (RQ) analysis. Data were analyzed via one-way analysis of variance (ANOVA) using SigmaPlot statistical software (version 11.0) followed by Tukey's multiple comparison test.

Results demonstrated that in fetal liver, lung, kidney and heart, expression of SOCS-3 mRNA increased with the progression of pregnancy, and the greatest transcript levels were observed at day 120 of pregnancy. In the liver, SOCS-3 mRNA expression at day 120 of gestation was more than 7-fold greater than that detected at the earliest stages of pregnancy. In pituitary expression level of SOCS-3 did not change during pregnancy. In brain SOCS-3 transcripts level were decreased. When comparing the level of SOCS-3 transcripts between tissues at the same stage of pregnancy, we found that the greatest expression occurred in the liver and lungs, and the lowest levels in tissues associated with the CNS.

Results indicate that SOCS-3 exhibits a differential expression profile in fetal tissues and the level of its expression changes during pregnancy. A more complete analysis of the mechanisms of SOCS-3 actions during different stages of fetal development could improve our knowledge about its roles in a number of physiological and pathological processes.

Supported by Polish National Science Centre (2013/09/B/NZ4/01532).

Wpływ transformującego czynnika wzrostu (TGF)- β 1 na ekspresję i uwalnianie metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów z komórek nabłonkowych błony śluzowej macicy kłaczy

The effect of transforming growth factor (TGF)- β 1 on expression and secretion of metalloproteinase and their tissue inhibitors from equine endometrial epithelial cells

Szóstek-Mioduchowska A.Z.^{1,*}, Pacewicz J.¹, Baćławska A.¹, Okuda K.², Skarzyński D.J.¹

¹*Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland;*

²*Graduate School of Environmental and Life Sciences, Okayama University, Okayama, Japan;*

*a.szostek-mioduchowska@pan.olsztyn.pl

Transformujący czynnik wzrostu (TGF)- β 1 jest jednym z głównych czynników zaangażowanych w procesy przebudowy tkanki i gojenia ran. Jego stężenie rośnie w błonie śluzowej macicy z rozwojem *endometrosis* u kłaczy. Badania wskazują, iż TGF- β 1 wpływa na proces przebudowy tkanek poprzez zwiększenie ekspresji białek przestrzeni pozakomórkowej (ECM), inhibitorów metaloproteinaz (MMP) (TIMP) oraz zmniejszenie syntezy i aktywności MMP. Podstawową funkcją MMP jest degradacja i przebudowa białek ECM i błony podstawnej naczyń. Z kolei, TIMP pełnią ważną rolę w ustaleniu równowagi pomiędzy procesem degradacji a syntezą składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Celem badań było określenie, czy TGF- β 1 może wpływać na procesy przebudowy tkanki poprzez wpływ na ekspresję i uwalnianie MMP oraz ich inhibitorów pochodzących z komórek nabłonkowych błony śluzowej macicy kłaczy *in vitro*.

Komórki nabłonkowe wyizolowane z błony śluzowej macicy kłaczy (n=5) były stymulowane przez TGF- β 1 w dawce 5 ng/ml przez 24 i 48 godz. Następnie, w medium hodowlanym oznaczano stężenie MMP-1,-2,-3,-9,-13 przy użyciu metody ELISA, natomiast ekspresję tych czynników na poziomie mRNA oznaczano przy użyciu metody Real-time PCR. Różnice statystyczne określające wpływ TGF- β 1 na ekspresję i uwalnianie MMP i TIMP z komórek nabłonkowych błony śluzowej macicy kłaczy określono za pomocą testu *t*-studenta.

TGF- β 1 nie wpłynął na uwalnianie MMP-2,-3 oraz MMP-13 ($P>0,05$), zwiększył natomiast uwalnianie MMP-1 i MMP-9 po 48 godz. z komórek nabłonkowych błony śluzowej macicy kłaczy ($P<0,05$). Dodatkowo, czynnik ten zwiększył uwalnianie TIMP-1 po 48 godz. oraz TIMP-2 po 24 godz. z komórek nabłonkowych błony śluzowej macicy kłaczy ($P<0,05$).

W błonie śluzowej macicy kłaczy ekspresja i uwalnianie MMP-1, MMP-9 i ich inhibitorów (TIMP-1, TIMP-2) pochodzenia nabłonkowego jest regulowana przez TGF- β 1. Sugeruje to udział MMP i ich inhibitorów pochodzenia nabłonkowego w procesie przebudowy ECM, zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych (*endometrosis*).

Praca wykonana w ramach projektu „Maestro” nr 2011/02/A/NZ5/00338 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Synteza prostacykliny i ekspresja jej receptorów w błonie mięśniowej macicy świni w cyklu rujowym i podczas wczesnej ciąży

Prostacyclin synthesis and prostacyclin receptor expression in the myometrium of cyclic and early pregnant gilts

Szymańska M., Łuba M., Blitek A.*

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn;

*a.blitek@pan.olsztyn.pl

Prostacyklina (prostaglandyna I₂; PGI₂) jest kluczowym czynnikiem regulującym funkcje naczyń krwionośnych, w tym kurczliwość mięśniówki. Ponadto, jest dominującą prostaglandyną syntezowaną w błonie mięśniowej macicy (*miometrium*) u kobiety. PGI₂ powstaje przy udziale syntazy PGI₂ (PGIS), a swoje działanie na komórki wywiera głównie poprzez receptory błonowe (PTGIR). Celem podjętych badań było określenie profili ekspresji PGIS i PTGIR oraz zawartości PGI₂ w *miometrium* podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży u świni.

Do badań wykorzystano fragmenty błony mięśniowej macicy pozyskiwane od loszek będących w następujących dniach cyklu rujowego: 3.-4., 6.-7., 10.-12., 15.-16. i 18.-20. (n=26) oraz ciąży: 10., 12., 15.-16., 18.-20., 25. i 30. (n=33). W pobranym *miometrium* określono: 1) ekspresję PGIS i PTGIR metodą qPCR i Western blot oraz 2) zawartość 6-keto PGF_{1α} (metabolit PGI₂) metodą ELISA. Wyniki poddano jedno- i dwuczynnikowej analizie wariancji ANOVA.

Ekspresja mRNA *PGIS* nie zmieniała się pomiędzy 10. a 30. dniem ciąży, natomiast w cyklu rujowym obserwowano tendencję do zwiększonej zawartości tego transkryptu w dniu 12. (P=0,06). Zawartość 6-keto PGF_{1α} zmieniała się jedynie w cyklu rujowym, stopniowo wzrastając pomiędzy dniami 3.-4. a 15.-16. (P<0,05). Ponadto, w 12. i 15.-16. dniu po owulacji, poziom 6-keto PGF_{1α} był wyższy w *miometrium* zwierząt będących w cyklu rujowym w porównaniu do loszek w ciąży. Poziom transkryptów *PTGIR* wzrastał po 20 dniu ciąży i był wyższy w dniach 25. i 30. w porównaniu do dni 10. i 18.-20. (P<0,01). Nie odnotowano zmian zawartości białek PGIS i PTGIR w badanym okresie cyklu rujowego i ciąży.

Podsumowując, profile ekspresji PGIS i zawartości PGI₂ w *miometrium* zmieniają się w zależności od dnia cyklu rujowego i/lub statusu reprodukcyjnego loszek. Zwiększona zawartość PGI₂ w dniach 12.-16. cyklu rujowego w porównaniu do ciąży wskazuje na udział PGI₂ w procesie wzmożonej kurczliwości *miometrium* w okresie luteolizy.

Praca finansowana ze środków statutowych IRZiBŻ PAN w Olsztynie.

INDEKS AUTORÓW

A

Abramik A. 120
Adamowski M. 102
Ajduk A. 76
Aksoy I. 42
Andronowska A. 49
Antushevich A. 125
Arena R. 106, 120

B

Bacławska A. 167
Baraniewicz M. 54
Barłowska K. 67
Bartlewski P.M. 94, 115
Baryła M. 141
Bąkowska M. 69
Bednarz A. 132
Bernat A. 42, 82
Beyer N.M. 139
Bielas W. 109
Bielawski K.P. 42
Bielecki W. 54, 109
Bieniek-Kobuszevska M. 165
Biernat W. 164
Bilińska B. 124, 126, 133
Blitek A. 168
Błaszczuk B. 69, 71
Bochenek J. 125
Bochenek M. 43
Bocheńska A. 164
Bogacka I. 58, 149, 150, 163
Bogdaszewski M. 146
Boos A. 139
Borsuk A. 164
Borsuk G. 94
Boruszevska D. 41, 44, 68, 77, 100
Brouze M. 76
Buchowski H. 58
Buss F. 81

C

Całka J. 127, 128
Cegła M. 119
Chełmońska-Soyta A. 54
Chernykh V.B. 35
Chincarini M. 140
Ciereszko A. 48, 53, 83, 86, 133
Ciereszko R.E. 46, 47, 51, 85, 87–89
Cieślak D. 41

Czaja E. 51, 161
Czelejska W. 122, 138
Czerniecki J. 43

D

Dawid P. 116
Dąbrowski R. 156
Depa-Martynów M. 36
Dietrich M.A. 45, 48, 83, 86
Dobrzyń K. 143–145, 154, 155, 157
Drwal E. 62
Duda M. 101
Dupont J. 98
Duszevska A.M. 54, 79, 105, 109
Dziekońska A. 55
Dziekoński M. 122, 138
Dzięcioł M. 123

F

Faundez R. 78
Filipowicz K. 103, 121
Florek W. 106, 140
Franczak A. 50, 64, 159
Fraser L. 84, 103, 118, 121

G

Gajda B. 104, 111
Gajda L. 111
Gajewska M. 78
Gajewski Z. 78, 153
Galvao A.M. 102
Gączarzewicz D. 69, 71
Gilun P. 60
Gizejewski Z. 165
Gogol P. 43
Gorczyca G. 101
Goryszewska E. 141
Górowska-Wójtowicz E. 133
Górski K. 130
Górzyńska I. 146
Grabarek J. 74
Gregoraszcuk E.Ł. 62
Greguła-Kania M. 94
Gręda P. 54, 79, 105
Gruszecki T. 94
Grycmacher K. 41, 44, 68, 77, 100
Grygier J. 94
Grzankowska M. 149
Grzegorzewska A.K. 99

Grzesiak M. 51, 98, 99
Grzmil P. 132
Gumułka M. 162
Guzewska M.M. 142

H

Hasiec M. 130
Hejmej A. 124, 126, 133
Herman A.P. 59, 125
Hrabia A. 99
Huaiyang J. 34
Huleyuk N. 35

I

Irnazarov I. 83

J

Jalali B.M. 92
Jana B. 127, 128
Jaros P. 115
Jaroszevski J.J. 160
Jastrzebski J.P. 47, 51, 88
Jezierski T. 123
Jędrzejczak P. 36
Jończyk A.W. 90
Judycska S. 48, 86

K

Kabała N. 164
Kaczmarek M.M. 45, 52, 63, 142, 153
Kaczyńska B. 149
Kaczyński P. 141
Kamieniczna M. 37
Kamińska A. 124, 126, 133
Kamińska B. 163
Kamiński T. 143–145, 154, 155, 157, 163
Kankofer M. 61, 156
Karasiński J. 136
Karol H. 83, 86
Karpeta A. 99
Karpiesiuk K. 103
Katarzyńska-Banasik D. 99
Kiełbasa A. 76
Kieżun M. 143–145, 154, 155, 157
Kirsz K. 164, 166
Kisievska K. 97, 143–145, 154, 155, 157
Knapczyk-Stwora K. 51, 161

- Kochan J. 70, 110
 Kolasa-Wołosniuk A. 75
 Konieczna K. 70
 Kopycińska K. 125
 Kordan W. 55, 84, 107, 108, 116, 117, 121, 129
 Kordeczka K. 131
 Korzekwa A. 134, 135, 146
 Kotlarska M. 106
 Kotula-Balak M. 124, 126, 133
 Kotwica G. 50, 64
 Kotwica J. 97, 139, 147, 148, 151
 Kowalczyk-Zięba I. 41, 44, 68, 77, 100
 Kowalewski M.P. 139
 Kowalik K. 99
 Kowalik M.K. 97, 139, 147, 148
 Kozioł K. 60
 Koziorowska-Gilun M. 55, 60
 Koziorowski M. 51, 60
 Krajza K. 147, 148
 Krawczyk M. 156
 Krawczyńska A. 59, 125
 Król K. 125
 Kruś J. 105
 Kunicka Z. 89, 149, 150
 Kurowska P. 91, 98
 Kurpanik K. 121
 Kurpisz M. 33–35, 37
 Kurzyńska A. 149, 150
- L**
 Lecewicz M. 107, 108
 Lechniak-Cieślak D. 72, 73
 Lenartowska M. 81
 Lendartowicz M. 132
 Lewicka M. 60
 Likso P. 92, 152
 Lipka A. 165
 Liszewska E. 83
 Loi P. 114, 140
- Ł**
 Łuba M. 168
 Łukasik K. 90, 93
 Łupicka M. 134, 135
- M**
 Maciejewska E. 73
 Madeja Z.E. 41, 67, 72–74
 Majewska A. 107, 108
- Malcher A. 33
 Małopolska M. 115
 Marciniak E. 130
 Marciniak M. 64
 Markiewicz W. 160
 Martyniak M. 50, 159
 Meller K.A. 127, 128
 Miciński B. 128
 Midro A.T. 35
 Mierzejewski K. 150
 Mietelska K. 129
 Miłoś A. 124, 126
 Misiakiewicz-Has K. 75
 Misztal T. 130, 131
 Młodawska W. 70, 110
 Młotkowska P. 158
 Młynarczyk J. 151
 Młynarczyk A. 70
 Modliński J.A. 79, 80, 82, 105, 106, 114, 140
 Mogielnicka-Brzozowska M. 84
 Molcan T. 46, 47, 85, 87–89
 Molik E. 131
 Mostek A. 48, 86
 Mościcki W. 71
 Moza Jalali B. 152
 Murawski M. 94, 115
 Myszczyński K. 52, 95
- N**
 Nahajło K. 131
 Najmuła J. 63
 Nitkiewicz A. 63
 Niwińska A. 78
 Nizański W. 53, 54, 56, 109, 112, 123
 Nowak A. 70, 110
 Nowak Z. 54
 Nowicka-Bauer K. 37
 Nowicki J. 115
 Nynca A. 46, 47, 51, 85, 87–89
- O**
 Ogórek M. 132
 Okólski A. 110
 Okrasa S. 122, 138
 Okuda K. 167
 Olech W. 54, 109
 Olszewska M. 34, 35
 Olszewski K. 94
 Opiela J. 113
- Orłowska K. 46, 47, 85, 87–89
 Orsztynowicz M. 41
 Orzeł I. 117
 Orzolek A. 129
 Ostrowski J. 78
- P**
 Pacewicz J. 167
 Panasiewicz G. 165
 Pardyak L. 124, 126, 133
 Partyka A. 54, 56, 109, 112
 Patkowski K. 94
 Paukszt L. 46, 47, 88
 Pawlak P. 41, 67, 72–74
 Pawlicki P. 124, 126
 Pers-Kamczyc E. 41
 Pęczkowicz-Szyska J. 106
 Piasecka M. 69
 Pieczewska B. 123
 Pierzchała O. 132
 Pietsch-Fulbiszevska A. 164
 Pilarczyk B. 69
 Piliszek A. 67, 74, 79, 80, 82, 105
 Pilutin A. 75
 Piotrowska-Tomala K.K. 90
 Plusa B. 74
 Polkowska J. 137
 Pollock N. 34
 Poniedziałek-Kempny K. 104, 111, 119
 Prochowska S. 56, 109
 Prokurat K. 76
 Przybył B.J. 137
 Przychodzka A. 76
 Przygodzka E. 52, 95, 96
 Ptak G.E. 27, 43, 120
- R**
 Rajkovic A. 34
 Rajska I. 104, 111, 119
 Rak A. 62, 91, 98
 Rame C. 98
 Rekawiecki R. 97, 147
 Reliszko Ż.R. 153
 Rędownicz M.J. 81
 Rodak O. 112
 Romanowicz K. 125, 131
 Roszkowicz-Ostrowska K. 130
 Rozenboim I. 162
 Różycka M. 98
 Ruszkowska M. 46, 47, 85, 87–89

- Rytelewska E. 143–145, 154, 155, 157
Rzeszotek S. 75
- S**
Sabat D.K. 76
Sadowska A. 46, 47, 85, 87–89
Sakowicz J. 165
Samiec M. 113
Sampino C. 140
Sampino S. 106, 114, 140
Sandowska-Markiewicz Z. 78
Sanfilippo J. 34
Savatier P. 42, 82
Saveljev A.P. 165
Schwarz T. 94, 115
Sechman A. 99
Siawrys G. 58, 163
Siejwa P. 150
Siemieniczuk J. 117
Sinderewicz E. 41, 44, 68, 77, 100
Skarżyński D.J. 90, 92, 93, 102, 152, 167
Skipor J. 125
Skowrońska A. 158
Skowroński M.T. 158
Skrzyszowska M. 113
Słomczyńska M. 51, 161
Słowińska M. 48, 84, 86, 133
Smolińska N. 143–145, 154, 155, 157, 163
Smorąg Z. 104
Soból K. 119
Socha B.M. 134, 135
Sokołowska G. 52
Sokołowski G. 78
Sowińska N. 164
Stachowiak A. 79
Stankiewicz A.M. 106
Stankiewicz T. 69, 71
Starzyński R.M. 106
Staszkiwicz J. 41, 44, 68, 77, 100
- Steiner-Bogdaszewska Ż. 146
Strzeżek R. 84, 107, 108, 116, 117
Swigonska S. 46, 47, 85, 87–89
Szafranska B. 165
Szczepańska A.A. 134, 135
Szczepańska K. 76
Szczesna M. 166
Szczubiał M. 156
Szeszko K. 143–145, 154, 155, 157
Szlis M. 137
Szóstek-Mioduchowska A.Z. 167
Szpila M. 76
Szumny A. 123
Szydłowska A. 149
Szymanowska A. 94
Szymańska M. 168
- Ś**
Świderek W. 78
- T**
Tański D. 158
Tomas J. 34
Tomaszewska-Zaremba D. 57, 59, 125
Tomza-Marciniak A. 69
Tracz M. 54
Trzcińska M. 43
Tuz R. 115
- U**
Udała J. 69, 71
- W**
Wacławik A. 96, 141
Ward M.A. 29
Wartalski K. 101, 136
Warzych E. 41, 72, 73
Wasilewska K. 55, 84, 103, 118
Waszkiewicz E. 64, 159
Wawrzykowski J. 156
Wawrzyn A. 166
- Wąsowska B. 60
Westfalewicz B. 48
Wiater J. 136
Wieczorek J. 119
Wiland E. 35
Winiarczyk D. 80
Wiszniewska B. 75
Wiśniewska A. 160
Witarski W. 110
Witek K.J. 49
Witek P. 51
Witkowski M. 110
Wocławek-Potocka I. 41, 44, 68, 77, 100
Wojciechowska A. 151
Wojtulewicz K. 59
Wołodko K. 102
Woszczyło M. 123
Woszczyński M. 78
Wójcik-Gładysz A. 137
Wójcik-Trechcińska U. 78
Wrona K. 138
Wysocki P. 84, 129
- Y**
Yatsenko A.N. 33–35
Yatsenko S.A. 34
- Z**
Zacchini F. 120
Zadroga A. 146
Zakrzewski P. 81
Zasiadczyk Ł. 103, 118, 121
Zastavna D. 35
Zernicka-Goetz M. 23
Zglejc K. 64, 159
Zięba D. 131, 166
Zięcik A.J. 49, 95, 96
- Ż**
Żmijewska A. 122, 138
Żyżyńska-Galeńska K. 82