

# AUTOREFERAT

## Opis dorobku i osiągnięć naukowych

**Dr inż. Tomasz Stankiewicz**

Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin

e-mail: [tomasz.stankiewicz@zut.edu.pl](mailto:tomasz.stankiewicz@zut.edu.pl)

## 1. Imię i nazwisko, adres do korespondencji

**Dr inż. Tomasz Stankiewicz**

Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ul. Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin

tel. 505 229 239; e-mail: [tomasz.stankiewicz@zut.edu.pl](mailto:tomasz.stankiewicz@zut.edu.pl)

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Tytuł zawodowy, stopnie i tytuł(y) naukowe	Rok uzyskania	Miejsce uzyskania	Dziedzina, dyscyplina
Doktor	28 marca 2007	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt; Tytuł rozprawy doktorskiej: <i>Próba określenia potencjału rozrodczego pęcherzyków jajnikowych oraz wpływu wybranych czynników środowiskowych i genetycznych na skład płynu pęcherzykowego oraz rozwój oocytów świńskich w warunkach in vitro.</i> Promotor: prof. dr hab. Jan Udała	Nauki rolnicze, zootechnika
Magister inżynier	12 czerwca 2002	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt; Tytuł pracy magisterskiej: <i>Profil zmian stężeń steroidowych hormonów jajnika i koncentracja cholesterolu we krwi kóz anglo-nubijskich w posynchronizacyjnym cyklu rujowym.</i> Promotor: prof. dr hab. Jan Udała	Kierunek studiów: Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia w produkcji zwierzęcej i ochronie środowiska

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Okres	Miejsce zatrudnienia	Stanowisko
Od 01-03-2010 do chwili obecnej	Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska	Adiunkt, 1/1 etat
Od 01-01-2009 r. do 28-02-2010 r.	Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska	Specjalista inżyniersko-techniczny, 1/1 etat
Od 01-06-2007 r. do 31-12-2008 r.	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Rozrodu Zwierząt	Specjalista inżyniersko-techniczny, 1/1 etat
Od 06-02-2007 r. do 31-05-2007 r.	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Rozrodu Zwierząt	Starszy referent techniczny, ½ etatu
Od 04-11-2002 r. do 30-09-2006 r.	Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Rozrodu Zwierząt Międzywydziałowe Studia Doktoranckie	Doktorant

**4. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego (zgodnie z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Wybrane transformujące czynniki wzrostu- $\beta$ , hormony i parametry biochemiczne u świń z torbielami i bez torbieli jajnikowych**

## 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Lp.	Autorzy i tytuł publikacji	IF*	Punkty MNiSW**
H1	<b>Stankiewicz T.</b> , Błaszczyk B. 2014: Concentrations of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in follicular cysts, mono- and polyocyte follicles in gilts. <i>Acta Veterinaria-Beograd</i> , 64 (1), 24-32.	0,375	15
H2	<b>Stankiewicz T.</b> , Błaszczyk B. 2016: Relationship between the concentration of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in pre-ovulatory follicles, ovarian cysts, and serum in sows. <i>Animal Production Science</i> , 56, (1), 141-146.	0,902	30
H3	<b>Stankiewicz T.</b> 2017: The relationships between transforming growth factors $\beta$ and free thyroxine and progesterone in the ovarian cysts, preovulatory follicles, and the serum of sows. <i>Archives Animal Breeding</i> , 60, (2), 131-136.	0,493	20
H4	<b>Stankiewicz T.</b> 2015: Biochemical composition of the fluid of ovarian cysts and pre-ovulatory follicles compared to the serum in sows. <i>Tierärztliche Praxis Großtiere</i> , 43, (4), 216-221.	0,305	15
H5	<b>Stankiewicz T.</b> , Błaszczyk B. 2015: Macro-elements compositions of cystic and follicular fluid in ovaries and their relationship to peripheral blood concentration in sows. <i>Acta Veterinaria-Beograd</i> , 65, (2), 217-225.	0,741	15
H6	<b>Stankiewicz T.</b> , Błaszczyk B., Lasota B., Mościcki W., Kołodziejska J. 2016: Beziehungen zwischen Progesteron und Immunglobulinen G und M in präovulatorischen Follikeln, Ovarialzysten und Serum beim Schwein. <i>Tierärztliche Umschau</i> , 71, (5), 173-180.	0,079	15
<b>Łącznie H1–H6</b>		<b>2,895</b>	<b>110</b>

\* współczynnik impact factor (IF) wykazany według bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się publikacji; dla publikacji H2 i H3 i H6 współczynnik IF wykazano za rok 2015.

\*\* liczba punktów według wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się publikacji; dla publikacji H2, H3 i H6 liczba punktów według wykazu czasopism naukowych MNiSW z dnia 9 grudnia 2016 roku.

Oświadczenia współautorów wraz z określeniem ich indywidualnego udziału zawarto w Załączniku nr 6.

Łączna liczba punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy wynosi **110** punktów.

Sumaryczny IF za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego według bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy wynosi **2,895**.

#### 4.3. Omówienie celu naukowego /artystycznego ww. pracy /prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Osiągnięcie naukowe pod tytułem: „**Wybrane transformujące czynniki wzrostu- $\beta$ , hormony i parametry biochemiczne u świń z torbielami i bez torbieli jajnikowych**” zostało udokumentowane cyklem sześciu publikacji powiązanych tematycznie.

Celem osiągnięcia naukowego była **ocena zależności oraz porównanie jajnikowych i obwodowych stężeń wybranych czynników wzrostu należących do nadrodziny transformujących czynników wzrostu  $\beta$  (TGFs- $\beta$ ), hormonów i parametrów biochemicznych u świń z torbielami i bez torbieli pęcherzykowych. Pracę tę wykonano w aspekcie bliższego wyjaśnienia patogenezy torbieli jajnikowych i ewentualnego zastosowania uzyskanych wyników w diagnostyce i zapobieganiu tych schorzeń u świń.**

Dla realizacji nadrzędnego celu naukowego wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- I. Określenie stężenia białka morfogenetycznego kości 15 (BMP-15) i czynnika wzrostowo-różnicującego 9 (GDF-9) w płynie torbieli pęcherzykowych i pęcherzyków jajnikowych oraz porównanie stężeń tych czynników w pęcherzykach mono- i polioocytowych u loszek.
- II. Określenie zależności i porównanie stężeń BMP-15 i GDF-9 w płynie torbieli pęcherzykowych, pęcherzyków przedowulacyjnych i surowicy u loch z torbielami i bez torbieli pęcherzykowych.
- III. Określenie zależności między stężeniem wolnej tyroksyny ( $FT_4$ ), progesteronu ( $P_4$ ) a stężeniem BMP-15 i GDF-9 w płynie torbieli pęcherzykowych, pęcherzyków przedowulacyjnych i surowicy u loch z torbielami i bez torbieli pęcherzykowych.
- IV. Określenie zależności i porównanie stężeń glukozy, białka całkowitego, cholesterolu całkowitego, lipoproteiny niskiej (LDL) i wysokiej gęstości (HDL) w płynie torbieli pęcherzykowych, pęcherzyków przedowulacyjnych i surowicy u loch z torbielami i bez torbieli pęcherzykowych.

- V. Określenie zależności i porównanie stężeń sodu, wapnia, magnezu i fosforu w płynie torbieli pęcherzykowych, pęcherzyków przedowulacyjnych i surowicy u loch z torbielami i bez torbieli pęcherzykowych.
- VI. Określenie zależności i porównanie stężeń progesteronu i immunoglobulin (IgG i IgM) w płynie torbieli pęcherzykowych, pęcherzyków przedowulacyjnych i surowicy u loch z torbielami i bez torbieli pęcherzykowych.

#### 4.3.1. Wprowadzenie i uzasadnienie podjętego tematu badań

Zaburzenia czynności jajników u świni domowej (*Sus scrofa f. domestica*) stanowią poważny problem diagnostyczny i są istotną przyczyną strat ekonomicznych w hodowli tego gatunku zwierząt (Ebbert i Bostedt, 1993; Fitko i wsp., 1996). Spośród wszystkich zaburzeń funkcji jajników u svin torbiele stanowią znaczny odsetek (Cech i Doležel, 2007; Szulańczyk-Mencel i wsp., 2010). Najczęściej stwierdza się je podczas obserwacji jajników pozyskanych poubojowo od loch wybrakowanych z powodu problemów w rozrodzie. Przy tym sposobie oceny częstotliwość występowania torbieli jajnikowych wynosi od 4,7 do 14% (Dalin i wsp., 1997; Karveliēne i wsp., 2007; Tummaruk i wsp., 2009). Jednak faktyczna liczba svin z tymi zaburzeniami jajnika może być znacznie większa i jak wskazują niektóre badania torbielowatość jajników może występować nawet u 50% samic w stadzie (Schmidt i wsp., 1995). Torbiele jajnikowe mogą powodować nieregularne lub wydłużone cykle rujowe oraz być przyczyną okresowej lub trwałej niepłodności (Ebbert i Bostedt, 1993; Fitko i wsp., 1996). Jajniki torbielowate u svin mogą być jednostronne lub obustronne, a torbiele pojedyncze lub mnogie. Duże znaczenie kliniczne mają zwłaszcza torbiele mnogie obecne na obu jajnikach, które częściej występują u loch niż u loszek stanowiąc przyczynę znacznego odsetka brakowania svin z powodu zaburzeń płodności (Heinonen i wsp., 1998, Cech i Doležel, 2007). W większości przypadków pojedyncze torbiele jajnikowe nie wpływają na płodność svin, ale utrzymywanie się ich na jajniku może predysponować do powstania wielu torbieli, które z kolei obniżają płodność u samic tego gatunku (Tummaruk i Kesdangsakonwut, 2012). Duże znaczenie kliniczne mają zwłaszcza torbiele pęcherzykowe (Szulańczyk-Mencel i wsp., 2010). Wywodzą się one z nieowulujących pęcherzyków jajnikowych, wypełnionych płynem i osiągają średnicę 11 mm i większą (Heinonen i wsp., 1998, Cech i Doležel, 2007, Sun i wsp.,

2011). Uważa się, że przyczyną torbieli są zaburzenia w mechanizmach odpowiedzialnych za rozwój pęcherzyków jajnikowych i owulację. Zaburzenia te dotyczą głównie dysfunkcji w centralnej regulacji neurohormonalnej osi podwzgórze-przysadka. Ponadto powstawaniu torbieli sprzyja zaburzona regulacja auto- i parakrynną w obrębie jajnika, a także czynniki środowiskowe (Stankiewicz i wsp., 2008).

Obecnie wiele badań dotyczących funkcji pęcherzyka jajnikowego skupia się nad znaczeniem czynników należących do nadrodziny transformujących czynników wzrostu  $\beta$  (TGFs- $\beta$ , ang. transforming growth factors  $\beta$ ) (Su i wsp., 2008; Knight i Glister 2006; Sun i wsp., 2010). Spośród tych czynników szczególną uwagę zwraca się na białko morfogenetyczne kości 15 (BMP-15, ang. bone morphogenetic protein-15) i czynnik wzrostowo-różnicujący 9 (GDF-9, growth differentiation factor-9). W obrębie pęcherzyka jajnikowego te dwa czynniki wydzielane są głównie przez oocyty (Su i wsp., 2008; Orisaka i wsp., 2009; Peng i wsp., 2010, Sun i wsp., 2010). Nie można więc wykluczyć, iż stężenie tych czynników w płynie pęcherzykowym może zależeć od liczby oocytów w pęcherzyku. Jak wiadomo większość pęcherzyków jajnikowych zawiera tylko jeden oocyt, ale u niektórych gatunków występują pęcherzyki zawierające większą ich liczbę (Safran i wsp. 1998; Payan-Carreira i Pires, 2008; Stankiewicz i wsp., 2009). Obecność pęcherzyków polioocytowych została udokumentowana między innymi w jajnikach świń (Stankiewicz i wsp., 2009). Jak dotychczas nie ma jednak jednoznacznego stanowiska określającego jakość takich pęcherzyków i znajdujących się w nich oocytów. Niemniej sugeruje się, że mogą one powstawać w wyniku zaburzeń folikulogenezy (Bristol-Gould i Woodruff, 2006). Uwzględniając fakt, że oocyty wykazują aktywność wydzielniczą i rozpatrując procesy zachodzące podczas folikulogenezy interesującym obiektem badań obok torbieli pęcherzykowych są również pęcherzyki polioocytowe.

Należy także uwzględnić, że źródłem BMP-15 i GDF-9 w pęcherzyku jajnikowym są nie tylko oocyty, ale również komórki somatyczne. Ekspresję matrycowego RNA (mRNA, ang. messenger RNA) GDF-9 i BMP-15 stwierdzono bowiem w różnych typach komórek pęcherzyków jajnikowych świni (Prochazka i wsp., 2004; Paradis i wsp., 2009). Dotychczasowe badania wykazały, że BMP-15 i GDF-9 poprzez parakrynną i autokrynną szlak sygnałowy wpływają na proliferację i różnicowanie komórek somatycznych pęcherzyka, steroidogenezę, owulację i luteinizację (Su i wsp., 2008; Orisaka i wsp., 2009; Peng i wsp., 2010; Sun i wsp.,

2010). W okresie przedowulacyjnym czynniki te biorą udział w procesie dojrzewania oocytu i ekspansji komórek cumulusa (Su i wsp., 2004; Paradis i wsp., 2009). Ponadto BMP-15 i GDF-9 uczestniczą w regulacji hormonalnej osi podwzgórze-przysadka-jajnik (Paulini i Melo, 2011). W zależności od etapu folikulogenezy nasilają lub osłabiają oddziaływanie gonadotropin na pęcherzyk jajnikowy wpływając na ekspresję receptorów dla hormonu luteinizującego (rLH, ang. Luteinizing Hormone receptor) (Knight i Glistler, 2006; Crawford i McNatty, 2012). Jest to szczególnie istotne w przypadku występowania torbieli pęcherzykowych, których bezpośrednią przyczyną są zakłócenia w oddziaływaniu hormonu luteinizującego na pęcherzyki jajnikowe (LH, ang. luteinizing hormone) (Ebbert i wsp., 1993; Fitko i wsp., 1996).

W regulacji funkcji świńskiego pęcherzyka jajnikowego oprócz gonadotropin, hormonów steroidowych i licznych czynników wzrostu ważną rolę odgrywają również hormony tarczycy. Ich obecność stwierdzono w płynie świńskich pęcherzyków jajnikowych (Stankiewicz i wsp., 2008). Ponadto w komórkach ziarnistych świńskich pęcherzyków przedowulacyjnych zidentyfikowano receptory dla hormonów tarczycy (Maruo i wsp., 1992). W badaniach *in vitro* wykazano, że hormony te wpływają na steroidogenezę w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej pozyskanych z pęcherzyków jajnikowych świni (Gregoraszcuk i Skalka, 1996). Ich udział w syntezie hormonów steroidowych zaznacza się poprzez wpływ na aktywność aromatazy (Gregoraszcuk i wsp., 1998). Hormony tarczycy wzmagają też działanie hormonu folitropowego (FSH, ang. Follicle Stimulating Hormone) w hodowlach świńskich komórek ziarnistych (Maruo i wsp., 1987). Należałoby również uwzględnić je w patogenezie zaburzeń folikulogenezy. Istnieją bowiem dane, że niedoczynność tarczycy wzmacnia powstawanie torbieli jajnikowych i osłabia aktywność steroidogenną jajników u loszek (Fitko i wsp., 1995, Fitko i wsp., 1996). Z kolei zaburzona steroidogeneza pęcherzykowa jest efektem i/lub przyczyną zaburzeń jajnikowych takich jak torbiele (Babalola i Shapiro, 1990; Szulańczyk-Mencel i wsp., 2010). Jednak dokładny mechanizm działania omawianych hormonów w patogenezie torbieli jajnikowych nie jest znany. Można jednak przypuszczać, że ich udział zaznacza się w interakcjach z innymi czynnikami działającymi lokalnie w obrębie jajnika i/lub obwodowo. Niewykluczone, że w tych interakcjach uczestniczą czynniki należące do TGFs-  $\beta$ .

W mechanizmie powstawania torbieli jajnikowych nie można wykluczyć zaburzeń związanych z układem immunologicznym, gdyż istnieje ścisła zależność pomiędzy układem hormonalnym i immunologicznym (Bukovsky i Caudle, 2008).



Wykazano, że status odpornościowy organizmu ulega zmianom pod wpływem różnych hormonów, w tym hormonów steroidowych jajnika (Beagley i Gockel, 2003; Harichandan i wsp., 2014). W odniesieniu do procesów rozrodczych uważa się, że cykliczne zmiany w wydzielaniu estrogenów i progesteronu wpływają na zmiany w immunologii żeńskich narządów rozrodczych (Beagley i Gockel, 2003). Układ rozrodczy uważany jest za część śluzówkowego układu odpornościowego (Hussein i wsp., 1983; de Buyscher, 1999). Narządy rozrodcze zawierają pełny zestaw komórek układu immunologicznego, które są odpowiedzialne zarówno za odporność wrodzoną jak i swoistą. Z kolei liczba i aktywność tych komórek różnią się istotnie podczas fazy cyklu płciowego i kontrolowane są zmianami stężeń hormonów steroidowych jajnika (Wira i Kaushic, 1996; Wira i wsp., 1999; Reibiger i Spanel-Borowski, 2000). Ma to uzasadnienie w tworzeniu obrony przeciw patogenom, na które narażony jest układ rozrodczy. Przypuszcza się, że immunoglobuliny w płynie pęcherzyków jajnikowych uczestniczą w procesach obronnych podczas transportu oocytów po owulacji (de Buyscher, 1999). Ponadto zaburzenia w układzie immunologicznym mogą prowadzić do patologii jajnika np. do przedwczesnego wygasania funkcji jajnika czy zmian nowotworowych (Bukovsky 2006; Bukovsky i Caudle, 2008). Nie można też wykluczyć, że zaburzenia te mogą mieć związek z patogenezą torbieli jajnikowych.

Bardzo ważnym elementem wpływającym na prawidłowe dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych jest płyn pęcherzykowy (Nandi i wsp., 2007). Jest on mieszaniną składającą się z wody i substancji rozpuszczonych pochodzących z osocza i produkowanych lokalnie przez komórki pęcherzyka jajnikowego, a także przez komórki układu immunologicznego. Badania nad zmianami metabolicznymi w płynie bydłących pęcherzyków jajnikowych wykazały, że analiza składu biochemicznego może w pewnym stopniu odzwierciedlać zmiany zachodzące w organizmie i odwrotnie (Leroy i wsp., 2004). Dlatego też skład płynu pęcherzykowego może ulegać zmianom nie tylko na skutek zaburzeń lokalnych, ale również w wyniku zmian w obwodowym krążeniu spowodowanych procesami patologicznymi (Arshad, 2005). Z badań przeprowadzonych u różnych gatunków zwierząt wynika, że spośród składników biochemicznych duże znaczenie w prawidłowym rozwoju pęcherzyka mają zarówno składniki organiczne jak i nieorganiczne (Bordoloi i wsp., 2001; Błaszczyk i wsp., 2006; Nandi i wsp., 2007; Alkalby i wsp., 2012; Kor i wsp., 2013; Kor i Moradi, 2013).

Skład płynu pęcherzykowego jest intensywnie badany nie tylko dla pogłębienia wiedzy na temat rozwoju pęcherzyków jajnikowych i dojrzewania oocytów, ale także

dla wyjaśnienia patogenezy torbieli pęcherzykowych (Mishra i wsp., 2003; Błaszczyk i wsp., 2006; Stankiewicz i wsp., 2008; Stankiewicz i wsp., 2008; Stankiewicz i wsp., 2009). Jak podają Khan i wsp. (2011) zaburzenia równowagi pomiędzy różnymi składnikami płynu pęcherzykowego mogą bowiem powodować zakłócenia w rozwoju pęcherzyków jajnikowych i owulacji prowadząc do powstawania torbieli pęcherzykowych. Jednakże, mimo istniejących badań dokładna patogeneza torbieli jajnikowych nie została w pełni wyjaśniona ani w przypadku świń, ani też samic innych gatunków ssaków.

#### 4.3.2. Uzyskane wyniki i ich omówienie

##### Realizacja celu pierwszego (cel szczegółowy I)

Dla realizacji tego celu przeprowadzono badania, których wyniki opublikowano w artykule pt. „Concentrations of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in follicular cysts, mono- and polyoocyte follicles in gilts”. W pracy tej wykonano dwa doświadczenia, które przeprowadzono na loszkach (wiek 7-8 miesięcy) poddawanych ubojowi w lokalnej rzeźni. W doświadczeniu pierwszym badaniami objęto 31 loszek z pojedynczymi torbielami pęcherzykowymi i 41 loszek bez torbieli. Do analiz przeznaczono płyn pęcherzykowy pozyskany z pęcherzyków o średnicy od 8 do 10 mm (n=41) i o średnicy od 5 do 8 mm (n=41) oraz płyn z torbieli pęcherzykowych (n=31). W doświadczeniu drugim do analiz przeznaczono płyn z pęcherzyków poli- (n=19) i monoocytowych (n=22). W uzyskanych próbkach określono stężenie BMP-15 i GDF-9.

Analiza wyników wykazała istotnie wyższe stężenie BMP-15 i GDF-9 w płynie z torbieli niż w płynie pęcherzykowym ( $P < 0.01$ ). Mogło być to efektem różnic w liczbie komórek somatycznych między pęcherzykami a torbielami lub różnym nasileniem ich aktywności wydzielniczej. Wykazano bowiem, że synteza BMP-15 i GDF-9 odbywa się we wszystkich typach komórek pęcherzyka jajnikowego (Paradis i wsp., 2009; Prochazka i wsp., 2004). Być może wysokie stężenia tych czynników w torbielach pęcherzykowych ma związek z odmiennym nasileniem steroidogenezy. U szczura GDF-9 wzmacnia bowiem syntezę androgenów w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego (Solovyeva i wsp., 2000). Pache i wsp. (1991) wykazali

natomiast, że androgeny odgrywają ważną rolę w genezie torbieli jajnikowych. Nie można zatem wykluczyć, iż specyficzne środowisko hormonalne w torbielach może wpływać na produkcję omawianych czynników. Należy również uwzględnić, iż w torbielach dochodzi do zaburzeń w interakcji międzykomórkowej, a efektem tych zaburzeń może być wysokie stężenie BMP-15 i GDF-9. Sun i wsp. (2012) wskazują, że powyższe czynniki GDF-9 mają wpływ na równowagę pomiędzy apoptozą a proliferacją komórek pęcherzykowych.

W związku z tym, iż głównym źródłem BMP-15 i GDF-9 w pęcherzyku jajnikowym jest oocyt, w niniejszej pracy określono także stężenie tych czynników w płynie pęcherzyków mono- i polioocytowych. Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie BMP-15 i GDF-9 w pęcherzykach polioocytowych było tylko nieznacznie wyższe niż w pęcherzykach monoocytowych, a oszacowane różnice nie były statystycznie istotne. Być może brak różnic spowodowany był zróżnicowaną aktywnością sekrecyjną oocytów z pęcherzyków polioocytowych, która w konsekwencji przyczyniła się do nieznacznie tylko wyższej koncentracji BMP-15 i GDF-9 w tych pęcherzykach. Potwierdzeniem tej sugestii są moje wcześniejsze badania, w których wykazano różną jakość oocytów z pęcherzyków polioocytowych (Stankiewicz i wsp., 2009). Z drugiej strony w pęcherzyku niezależnie od liczby oocytów i ich aktywności sekrecyjnej mogą istnieć mechanizmy utrzymujące optymalne stężenie BMP-15 i GDF-9 dla prawidłowej folikulogenezy.

W przedstawionej pracy wykazano dodatnią korelację między stężeniem BMP-15 i GDF-9. Korelację taką zanotowano zarówno w pęcherzykach jajnikowych, jak i torbielach pęcherzykowych. Wyniki te potwierdzają synergistyczne działanie BMP-15 i GDF-9 i potrzebę uwzględniania tych dwóch czynników w kompleksowej analizie procesów zachodzących w jajniku ssaków (Su i wsp., 2004; Knight i Glister, 2006).

Podsumowując wyniki uzyskane w niniejszej pracy należy podkreślić, że zgodnie z moją wiedzą po raz pierwszy określono i wykazano obecność BMP-15 i GDF-9 w płynie torbieli pęcherzykowych u loszek. Wykazane różnice w ich stężeniu między pęcherzykami jajnikowymi a torbielami pęcherzykowymi sugerują ich związek z zaburzeniami folikulogenezy. Ponadto niniejsze badania wydają się wskazywać, że liczba oocytów w pęcherzykach jajnikowych nie wpływa na wewnątrzpęcherzykowe stężenie BMP-15 i GDF-9.

## Realizacja celu drugiego (cel szczegółowy II)

Uwzględniając wyniki uzyskane w omówionej powyżej pracy postanowiono zbadać, czy podobne zależności w zakresie kształtowania się stężeń BMP-15 i GDF-9 w torbielach i pęcherzykach jajnikowych występują również u loch z jajnikami wielotorbielowatymi. Postanowiono też zbadać, czy ewentualne różnice dotyczą także stężeń tych czynników w surowicy badanych loch, co mogłoby mieć zastosowanie praktyczne w diagnostyce torbieli. Wyniki tej pracy opublikowano w artykule pt.: „Relationship between the concentration of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in pre-ovulatory follicles, ovarian cysts, and serum in sows”.

Badania przeprowadzono na lochach wieloródkach (wiek 2-3 lata), które poddawano ubojowi w lokalnej rzeźni. Podczas uboju z żyły szyjnej zewnętrznej od każdej badanej lochy pozyskiwano krew. Łącznie przebadano 46 loch, w tym 20 loch, u których poubojowo stwierdzono jajniki wielotorbielowate oraz 26 loch z pęcherzykami przedowulacyjnymi. Dla każdej lochy przyporządkowano jedną próbkę płynu (z torbieli lub pęcherzyka) i odpowiednią próbkę surowicy. W uzyskanych próbkach oznaczono stężenie BMP-15 i GDF-9.

W niniejszej pracy podobnie jak u loszek stwierdzono obecność BMP-15 i GDF-9 w płynie pęcherzykowym co potwierdza, iż czynniki te są składowymi tworzącymi mikrośrodowisko pęcherzykowe u świń. Wykazano też istotne różnice pomiędzy stężeniem BMP-15 i GDF-9 w płynie torbieli pęcherzykowych a stężeniem tych czynników w pęcherzykach przedowulacyjnych loch. Okazało się, że w torbielach stężenie BMP-15 i GDF-9 było wyższe niż w płynie pęcherzykowym ( $P < 0.01$ ). Między obydwoimi badanymi czynnikami stwierdzono dodatnią korelację ( $P < 0.01$  lub  $P < 0.05$ ). Ponadto w surowicy loch, u których stwierdzono torbiele pęcherzykowe stężenie BMP-15 i GDF-9 było statystycznie istotnie wyższe niż u loch bez torbieli ( $P < 0.05$  i  $P < 0.01$ , odpowiednio). Wykazano też dodatnie korelacje między stężeniem BMP-15 w surowicy a stężeniem tego czynnika w pęcherzykach przedowulacyjnych i torbielach pęcherzykowych ( $P < 0.01$  i  $P < 0.05$ , odpowiednio). Dodatnią korelację stwierdzono także między stężeniem GDF-9 w surowicy i płynie z torbieli ( $P < 0.05$ ).

Możliwym wytłumaczeniem dodatnich zależności między stężeniem BMP-15 i GDF-9 w płynie badanych struktur jajnikowych a ich stężeniem w surowicy jest fakt, że płyn pęcherzykowy jest produktem zarówno aktywności sekrecyjnej pęcherzyka, jak i

przesączeniem osocza krwi, a z drugiej strony stężenie wielu substancji biologicznie czynnych we krwi odzwierciedla aktywność sekrecyjną i status pęcherzyka (Leroy i wsp., 2004). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują zatem, że BMP-15 i GDF-9 mogą przenikać barierę krew-pęcherzyk. Nie można jednak wykluczyć, iż źródłem BMP-15 i GDF-9 we krwi mogą być również inne komórki narządów pozajajnikowych. Ekspresję GDF-9 mRNA stwierdzono w podwzgórzu, przysadce, macicy i szpiku kostnym u różnych gatunków ssaków (Fitzpatrick i wsp., 1998).

Uzyskane wyniki mogą dostarczać pewnych informacji na temat roli czynników należących do nadrodziny transformujących czynników wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) w mechanizmie powstawania zaburzeń jajnikowych. Zgodnie z moją wiedzą, po raz pierwszy wykazano bowiem obecność BMP-15 i GDF-9 w płynie torbieli jajnikowych u loch oraz stwierdzono dodatnią zależność między stężeniem tych czynników w płynie pęcherzykowym/torbieli pęcherzykowych a surowicą. Nie można więc wykluczyć, iż określenie stężenia BMP-15 i GDF-9 w surowicy może być pomocne w diagnozowaniu wielotorbielowatości jajnikowej u loch.

### Realizacja celu trzeciego (cel szczegółowy III)

Wyniki uzyskane w przedstawionych dwóch powyższych pracach wskazywały na konieczność prowadzenia dalszych badań nad ewentualnymi zależnościami między czynnikami należącymi do TGFs- $\beta$  a innymi czynnikami działającymi lokalnie w obrębie jajnika i/lub obwodowo. Dlatego też w kolejnej pracy określono zależności między stężeniem BMP-15 a stężeniem wolnej tyroksyny (FT<sub>4</sub>) i progesteronu (P<sub>4</sub>) u loch z torbielami i bez torbieli pęcherzykowych. Wyniki tej pracy opublikowano w artykule pt. „The relationships between transforming growth factors  $\beta$  and free thyroxine and progesterone in the ovarian cysts, pre-ovulatory follicles, and the serum of sows”.

Badania przeprowadzono na lochach (wiek od 2 do 3 lat) ubijanych w lokalnej rzeźni. Podczas uboju z żyły szyjnej zewnętrznej od każdej badanej lochy pozyskiwano krew. Od loch, u których stwierdzono wielotorbielowatość jajników (n=26) pozyskiwano płyn z torbieli, a od loch z pęcherzykami przedowulacyjnymi (n=26) pozyskiwano płyn pęcherzykowy. Dla każdej lochy przyporządkowano jedną próbkę płynu (z torbieli lub pęcherzyka) i odpowiednią próbkę surowicy. W uzyskanych próbkach oznaczono stężenie BMP-15, GDF-9, FT<sub>4</sub> i P<sub>4</sub>.

W surowicy loch, u których na jajnikach występowały torbiele, stężenie BMP-15 i GDF-9 było dodatnio skorelowane ze stężeniem FT<sub>4</sub> (P<0.01 i P<0.05, odpowiednio). Stężenie progesteronu było natomiast dodatnio skorelowane ze stężeniem BMP-15 w surowicy loch, u których nie stwierdzono torbieli pęcherzykowych. Z kolei udział BMP-15 i GDF-9 w patogenezie torbieli pęcherzykowych u sów sugerowano we wcześniejszych pracach (Stankiewicz i Błaszczuk, 2014; Stankiewicz i Błaszczuk, 2016). Ponadto czynniki te w zależności od etapu folikulogenezy mogą nasilać lub osłabiać oddziaływanie gonadotropin na pęcherzyk jajnikowy (Knight i Glister, 2006; Crawford i wsp., 2012). Natomiast interakcyjny wpływ hormonów tarczycy i gonadotropin na powstawanie torbieli pęcherzykowych wykazano u loszek (Fitko i wsp., 1995; Fitko i wsp., 1996). Dlatego też zanotowane interakcje między BMP-15, GDF-9 a FT<sub>4</sub> u loch z torbielami mogą być związane z obwodową kontrolą oddziaływania gonadotropin na jajnik. Jest to możliwa droga działania BMP-15, GDF-9 i FT<sub>4</sub> w mechanizmie powstawania torbieli pęcherzykowych u loch. Rozpatrując lokalne działanie hormonów tarczycy w obrębie jajnika interesujące są wyniki w niniejszej pracy dotyczące stężenia FT<sub>4</sub> w badanych strukturach jajnikowych. Stężenie FT<sub>4</sub> w torbielach było istotnie wyższe niż w pęcherzykach (P<0.01). Podobne relacje wykazano w przypadku progesteronu, co koresponduje z obserwacjami innych autorów w tym zakresie (Babalola i Shapiro, 1990; Kozłowska i wsp., 2013).

Wyniki przeprowadzonego doświadczenia mogą być przydatne do wyjaśnienia potencjalnej roli tarczycy, aktywności steroidogennej i czynników należących do nadrodziny transformujących czynników wzrostu  $\beta$  w mechanizmie powstawania wielotorbielowości jajników u loch.

#### Realizacja celu czwartego (cel szczegółowy IV)

W kolejnej pracy przeanalizowano, czy odzwierciedleniem zaburzeń folikulogenezy są także zmiany w składzie biochemicznym płynu tworzącego mikrośrodowisko rozwoju pęcherzyka jajnikowego. Wyniki tej pracy opublikowano w artykule pt.: „Biochemical composition of the fluid of ovarian cysts and pre-ovulatory follicles compared to the serum in sows”.

Badania przeprowadzono na lochach w wieku od 2 do 3 lat, ubijanych w lokalnej rzeźni. Podczas uboju z żyły szyjnej zewnętrznej od każdej badanej lochy

pozyskiwano krew. Od loch, u których stwierdzono wielotorbielowatość jajników (n=21) pozyskiwano płyn z torbieli, a od loch z pęcherzykami przedowulacyjnymi (n=22) pozyskiwano płyn pęcherzykowy. Dla każdej lochy przyporządkowano jedną próbkę płynu (z torbieli lub pęcherzyka) i odpowiednią próbkę surowicy. W uzyskanych próbkach oznaczono stężenie glukozy, białka całkowitego, cholesterolu całkowitego, lipoproteiny niskiej (LDL) i wysokiej gęstości (HDL).

W niniejszej pracy stężenie glukozy i białka w surowicy było istotnie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i torbielach pęcherzykowych ( $P < 0.01$ ). Wyższe stężenie tych składników w osoczu krwi niż w pęcherzykach jajnikowych stwierdzono także u innych gatunków zwierząt (Arshad i wsp., 2005; Alkalby i wsp., 2012). Wyniki te potwierdzają, że skład biochemiczny płynu pęcherzykowego jest podobny, ale nie identyczny ze składem osocza krwi. Ponadto w torbielach stężenie glukozy było istotnie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych ( $P < 0.01$ ). Wyniki te mogą wskazywać na różnice w metabolizmie glukozy i różne jej zużycie w torbielach i pęcherzykach jajnikowych. Glukoza jest głównym źródłem energii dla pęcherzyków jajnikowych, które są strukturami bardzo dynamicznymi (Nandi i wsp., 2007). Zachodzą w nich intensywne przemiany morfologiczne i czynnościowe, natomiast w torbielach pęcherzykowych dochodzi do degeneracji warstwy ziarnistej (Zhou i wsp., 2008). Nie można też wykluczyć, iż różnice w stężeniu glukozy między torbielami a pęcherzykami przedowulacyjnymi spowodowane są zmianami hormonalnymi wpływającymi na przemiany energetyczne (Braw-Tal i wsp., 2009). Innym możliwym wyjaśnieniem różnic w stężeniu glukozy mogą być różnice w przepuszczalności bariery krew-pęcherzyk. Podczas folikulogenezy ultrastruktura tej bariery ulega zmianom, a nieprawidłowe jej funkcjonowanie może być przyczyną zaburzeń jajnikowych (Siu i Cheng, 2012). U myszy zwiększenie przepływu krwi i wzrost przepuszczalności bariery krew-pęcherzyk zaangażowane są w patogenezę zespołu politorbielowatości jajników (Zhou i wsp., 2008). W prezentowanej pracy nie stwierdzono natomiast różnic w stężeniu białka całkowitego pomiędzy torbielami a pęcherzykami, co koresponduje z wynikami uzyskanymi przez Khan i wsp. (2011) u bawoła wodnego.

W przedstawionej pracy stężenie cholesterolu całkowitego, HDL, LDL i trójglicerydów w surowicy loch z torbielami było istotnie wyższe niż u loch bez torbieli ( $P < 0.01$  lub  $P < 0.01$ ). Wyniki te mogą wskazywać na występowanie zależności między zmianami stężeń lipidów we krwi a patogenezą torbieli pęcherzykowych. Z badań wykonanych głównie u kobiet wynika bowiem, że niekorzystne zmiany w gospodarce

lipidowej są ważnym czynnikiem sprzyjającym powstawaniu torbieli jajnikowych (Bostanci i wsp., 2012). W niniejszej pracy różnice w stężeniu lipidów dotyczyły również badanych struktur jajnikowych. W płynie pęcherzykowym stężenie HDL i trójglicerydów było istotnie wyższe niż w płynie torbieli pęcherzykowych ( $P < 0.01$ ). Zanotowane różnice w stężeniu HDL między torbielami a pęcherzykami wynikają najprawdopodobniej z różnic w nasileniu steroidogenezy. Na taką możliwość wskazują prace innych autorów (Huang i wsp., 2002; Thangavel i Nayeem 2004). Z wielu badań wynika, że w płynie pęcherzykowym brak jest lipoproteiny o niskiej gęstości, a główną lipoproteiną biorącą udział w syntezie hormonów steroidowych jest HDL (Chang i wsp., 1976; Brantmeier i wsp., 1987; Le Goff 1994; Błaszczuk i wsp., 2006). W prezentowanej pracy nie stwierdzono obecności LDL nie tylko w pęcherzykach jajnikowych, ale również w torbielach pęcherzykowych. Wyniki te wskazują, że zarówno w pęcherzykach jak i strukturach patologicznych w syntezie hormonów steroidowych uczestniczy głównie lipoproteina wysokiej gęstości.

Wykazane w prezentowanej pracy różnice w składzie biochemicznym płynu pęcherzyków przedowulacyjnych i torbieli pęcherzykowych wskazują na różnice w nasileniu przebiegu procesów metabolicznych w strukturach fizjologicznych i patologicznych jajnika. Ponadto stwierdzone różnice w stężeniu składników biochemicznych w surowicy loch z wielotorbielowatością pęcherzykową i loch bez torbieli sugerują związek przemian ogólnoustrojowych z patogenezą torbieli pęcherzykowych.

#### Realizacja celu piątego (cel szczegółowy V)

W kolejnej pracy postanowiono zbadać, czy różnice w składzie biochemicznym między torbielami a pęcherzykami przedowulacyjnymi u sów dotyczą również składników mineralnych. Wyniki tej pracy opublikowano w artykule pt.: „Macroelements compositions of cystic and follicular fluid in ovaries and their relationship to peripheral blood concentration in sows”. Badania wykonano na lochach, u których w czasie uboju pobierano krew z żyły szyjnej zewnętrznej. Łącznie przebadano 46 loch, w tym 20 loch z torbielami pęcherzykowymi i 26 loch, u których nie stwierdzono torbieli, a na jajnikach występowały pęcherzyki przedowulacyjne. Dla każdej lochy przyporządkowano jedną próbkę płynu (z torbieli lub pęcherzyka) i odpowiednią



próbkę surowicy. W uzyskanych próbkach oznaczono stężenie jonów sodowych ( $\text{Na}^+$ ) oraz wapnia całkowitego (Ca), magnezu (Mg) i fosforu (P).

W niniejszej pracy stężenie sodu w surowicy loch było istotnie wyższe niż w płynie pęcherzykowym i płynie z torbieli ( $P < 0.01$ ), ale zbliżone do stężenia, jakie zanotowali inni autorzy u świń (Prvulović i wsp., 2007; Dobrzański i wsp., 2010). Podobne różnice między stężeniem tego pierwiastka w surowicy (lub osoczu krwi) a stężeniem w płynie pęcherzykowym zanotowano również u innych gatunków zwierząt (Arshad i wsp., 2005; Leroy i wsp., 2004; Alves i wsp., 2014). Jednakże w prezentowanej pracy stężenie sodu w płynie z torbieli było istotnie wyższe niż w płynie pęcherzykowym ( $P < 0.05$ ). Być może spowodowane to było zaburzeniami związanymi z prawidłową produkcją płynu antralnego w tych patologicznych strukturach jajnika. Sód jest bowiem głównym elektrolitem płynu zewnątrzkomórkowego i poprzez utrzymanie ciśnienia osmotycznego bierze udział w regulacji gospodarki wodno-elektrolitowej i odgrywa zasadnicze znaczenie w regulacji przepuszczalności błon komórkowych. Na poziomie pęcherzyka jajnikowego wpływa na zmiany przepuszczalności tekalnych naczyń kapilarnych i bierze udział w mechanizmie gromadzenia się płynu antralnego (Sharma i wsp., 1995; Rodgers i Irving-Rodgers, 2010).

Kolejnym badanym makroelementem był wapń całkowity, którego stężenie w płynie z torbieli było wyższe niż w płynie pęcherzykowym, ale różnice te nie były statystycznie istotne. Uwagę zwracają natomiast wykazane różnice w stężeniu wapnia w surowicy. U loch z torbielami było ono znacznie niższe i różniło się statystycznie od stężenia zanotowanego u loch bez torbieli pęcherzykowych ( $P < 0.01$ ). W surowicy loch bez torbieli stężenie tego makroelementu było zbliżone do stężenia, jakie zanotowali inni autorzy u świń (Prvulović i wsp., 2007; Winnicka, 2008; Dobrzański i wsp., 2010). Niższe stężenie wapnia w surowicy loch z wielotorbielowością jajników sugeruje, że niedobór tego makroelementu w obwodowym krążeniu może być czynnikiem sprzyjającym powstawaniu torbieli pęcherzykowych. W medycynie ludzkiej w leczeniu zespołu wielotorbielowatych jajników podkreśla się skuteczność suplementacji wapnia i witaminy D (Firouzabadi i wsp., 2012). Ponadto wapń odgrywa ważną rolę w reprodukcji zwierząt, a jego niedobór wpływa negatywnie na ich płodność (Subha, 2013). Z drugiej strony wykazano pozytywną korelację między stężeniem wapnia w płynie pęcherzykowym a liczbą zdegenerowanych oocytów u krów mlecznych (Alves i wsp., 2014).

W niniejszej pracy stężenie magnezu w surowicy loch bez torbieli było zbliżone do stężenia, jakie zanotowali inni autorzy u świń (Klem i wsp., 2009, Dobrzański i wsp., 2010). Jednak w surowicy loch z torbielami było ono istotnie niższe niż u loch bez torbieli ( $P < 0.01$ ); poniżej wartości obserwowanych u świń. Wyniki te sugerują, że podobnie jak w przypadku wapnia również niskie stężenie magnezu w obwodowym krążeniu może być czynnikiem sprzyjającym powstawaniu torbieli pęcherzykowych. W prezentowanej pracy wykazano też różnice między stężeniem magnezu w surowicy a jego stężeniem w badanych strukturach jajnika. W surowicy stężenie magnezu było niższe niż w torbielach i pęcherzykach przedowulacyjnych ( $P < 0.01$  i  $P < 0.05$ , odpowiednio). Niższe stężenie tego makroelementu w surowicy niż w pęcherzykach jajnikowych zanotowano również u krów (Yamada i wsp., 1998). Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu magnezu między pęcherzykami a torbielami, a wartości stężeń były zbliżone do zanotowanych w dużych pęcherzykach u owiec (Nandi i wsp., 2007).

Różnice między pęcherzykami a torbielami zanotowano natomiast w stężeniu fosforu. W płynie pozyskanym z torbieli było ono istotnie niższe niż w płynie pęcherzykowym ( $P < 0.05$ ). Z kolei stężenie fosforu w surowicy badanych loch było zbliżone i porównywalne do stężenia notowanego w innych pracach u świń (Dubreuil i Lapiere, 1997; Dobrzański i wsp., 2010, Cooper i wsp., 2014).

Zanotowane różnice w stężeniu makroelementów w pęcherzykach przedowulacyjnych i torbielach pęcherzykowych sugerują zmienne nasilenie procesów metabolicznych w strukturach patologicznych i fizjologicznych jajnika. Ponadto uzyskane wyniki wskazują, że makroelementy obecne zarówno w surowicy jak i płynie pęcherzykowym mogą wpływać na prawidłowe dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, a zmiany w ich stężeniach mogą być czynnikiem sprzyjającym powstawaniu torbieli pęcherzykowych.

#### Realizacja celu szóstego (cel szczegółowy VI)

Uwzględniając znaczenie układu immunologicznego w prawidłowym funkcjonowaniu jajnika w kolejnej pracy przeanalizowano stężenia immunoglobulin w płynie torbieli jajnikowych, pęcherzyków przedowulacyjnych i surowicy loch. Uwzględniono też obecność lub brak ciałek żółtych na jajnikach. Określono również zależności pomiędzy stężeniem immunoglobulin a stężeniem progesteronu.

Łącznie przebadano 77 loch, w tym 20 loch z torbielami i bez ciałek żółtych ( $CL^-$ ), 18 loch z torbielami i ciałkami żółtymi ( $CL^+$ ), 20 loch, u których nie stwierdzono torbieli, a na jajnikach występowały pęcherzyki przedowulacyjne i 19 loch, u których na jajnikach oprócz pęcherzyków przedowulacyjnych występowały ciała krwawe/żółte ( $CL^+$ ). Dla każdej lochy przyporządkowano jedną próbkę płynu (z torbieli lub pęcherzyka) i odpowiednią próbkę surowicy. W uzyskanych próbkach oznaczono stężenie progesteronu ( $P_4$ ), immunoglobulin klasy M (IgM) i G (IgG).

W surowicy loch, u których na jajnikach występowały ciała żółte stężenie  $P_4$  było istotnie wyższe niż u loch bez ciałek żółtych ( $P < 0.01$ ). Ponadto stężenie  $P_4$  u loch z ciałkami żółtymi i torbielami było istotnie wyższe niż u loch z ciałkami żółtymi, ale bez torbieli ( $P < 0.01$ ). Nie uwzględniając natomiast obecności ciałek żółtych oszacowane różnice między stężeniem tego hormonu w surowicy loch z torbielami i bez torbieli nie były statystycznie istotne. Statystycznie istotne różnice zanotowano natomiast między stężeniem  $P_4$  w płynie pęcherzykowym i pozyskanym z torbieli. W torbielach było ono wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych ( $P < 0.01$ ). Podobnie kształtowały się różnice po uwzględnieniu obecności ciałek żółtych. Ponadto u loch, u których występowały ciała żółte stężenie  $P_4$  w badanych strukturach jajnikowych było wyższe niż u loch bez ciałek żółtych ( $P < 0.01$ ).

Zanotowane w niniejszej pracy wyższe stężenie  $P_4$  w płynie z torbieli niż w płynie pęcherzykowym koresponduje z wynikami innych autorów (Babalola i Shapiro, 1990; Kozłowska i wsp., 2013). Jednak stężenie progesteronu w badanych strukturach jajnikowych i surowicy zależało od obecności na jajnikach ciałek żółtych. Potwierdza to potrzebę uwzględniania obecności bądź braku ciałek żółtych w kryteriach podziału torbieli jajnikowych u loch (Ebbert i Bostedt, 1993). Jest to ważne, zwłaszcza, że aktywność steroidogenna ciałek żółtych warunkuje wyższe stężenie obwodowego progesteronu (Niswender i wsp., 1994). Może to wpływać na układ immunologiczny, ponieważ status odpornościowy organizmu ulega zmianom pod wpływem hormonów steroidowych jajnika (Harichandan i wsp., 2014). Uważa się, że zmiany stężeń tych hormonów zmieniają aktywność układu immunologicznego całego układu rozrodczego (de Buyscher, 1999).

Miernikiem tej aktywności są zmiany ilościowe komórek układu immunologicznego, a także zmiany stężeń immunoglobulin. W przedstawionej pracy stężenie IgM i IgG w surowicy loch z torbielami było istotnie wyższe niż u loch bez torbieli ( $P < 0.05$ ). Również w płynie z torbieli stężenie tych dwóch immunoglobulin było wyższe niż w

płynie pęcherzyków przedowulacyjnych ( $P < 0.01$ ). Nie można więc wykluczyć, że zanotowane różnice mogły wynikać między innymi z różnic w stężeniu obwodowego progesteronu. W prezentowanej pracy wykazano bowiem dodatnią korelację między stężeniem  $P_4$  w surowicy a stężeniem IgM w pęcherzykach i torbielach ( $P < 0.05$ ).

Wykazane w pracy różnice w ilościowym składzie immunoglobulin klasy IgM i IgG i progesteronu, a także stwierdzone zależności między tymi parametrami wskazują na związek układu immunologicznego z patogenezą torbieli jajnikowych u loch. Dlatego w badaniach nad zaburzeniami folikulogenezy sugeruje się konieczność uwzględniania układu immunologicznego.

## Podsumowanie

Wyniki przedstawione w cyklu sześciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe pt.: **„Wybrane transformujące czynniki wzrostu- $\beta$ , hormony i parametry biochemiczne u świń z torbielami i bez torbieli jajnikowych”** stały się podstawą do wyciągnięcia następujących wniosków:

- I. Badane transformujące czynniki wzrostu- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wchodzą w skład mikrośrodowiska płynu pęcherzykowego i płynu torbieli pęcherzykowych u losek i loch. Stężenie tych czynników w torbielach jest znacznie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych, co wskazuje na ich udział w procesach związanych z zaburzonym przebiegiem folikulogenezy u świń. Wykazano jednocześnie dodatnią zależność między jajnikowym stężeniem BMP-15 i GDF-19 a stężeniem tych czynników we krwi, co może mieć znaczenie w diagnozowaniu torbieli pęcherzykowych u świń.
- II. Wykazane różnice i zależności między stężeniem wolnej tyroksyny, progesteronu, BMP-15 i GDF-9 w pęcherzykach jajnikowych, torbielach pęcherzykowych i surowicy wskazują na interakcyjny ich udział w procesach dojrzewania pęcherzyków jajnikowych u świń. Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w dalszych pracach nad wielotorbielowatością jajników u świń.
- III. Ilościowe różnice w składzie biochemicznym i jonowym płynu pęcherzykowego i płynu z torbieli wskazują na znaczne różnice w przebiegu procesów metabolicznych w strukturach fizjologicznych i patologicznych jajnika. Uzyskane wyniki wskazują

ponadto na występowanie związków między przemianami ogólnoustrojowymi z patogenezą torbieli pęcherzykowych.

- IV. Wykazane różnice w stężeniach immunoglobulin klasy IgM i IgG w pęcherzykach jajnikowych, torbielach pęcherzykowych i surowicy wskazują na związek układu immunologicznego z patogenezą torbieli jajnikowych u loch. Dlatego w badaniach nad zaburzeniami folikulogenezy sugeruje się konieczność uwzględniania układu immunologicznego.

#### Piśmiennictwo:

1. Alkalby J.M.A., Bushra F.H., Fahad T.A.: Study on some hormonal and biochemical constituents of follicular fluid and blood plasma in buffaloes. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 11, 90–102, 2012.
2. Alves B.G., Alves K.A., Lúcio A.C., Martins M.C., Silva T.H., Alves B.G., Braga L.S., Silva T.V., Viu M.A., Beletti M.E., Jacomini J.O., Santos R.M., Gambarini M.L.: Ovarian activity and oocyte quality associated with the biochemical profile of serum and follicular fluid from Girolando dairy cows postpartum. *Animal Reproduction Science*, 146, 117–125, 2014.
3. Arshad H.M., Ahmad N., Rahman Z.U., Samad H.A., Akhtar N., Ali S.: Studies on some biochemical constituents of ovarian follicular fluid and peripheral blood in buffaloes. *Pakistan Veterinary Journal*, 25, 189–193, 2005.
4. Babalola G.O., Shapiro B.H.: Sex steroid changes in porcine cystic ovarian disease. *Steroids*, 55, 319–324, 1990.
5. Beagley K.W., Gockel C.M.: Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38, 13–22, 2003.
6. Błaszczyk B., Stankiewicz T., Udała J., Gączarzewicz D., Lasota B., Błaszczyk P., Szymańska A., Szymańska-Pasternak J.: Free thyroid hormones and cholesterol in follicular fluid of bovine ovaries. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 50, 189–193, 2006.
7. Bordoloi P.K., Sarmah B.C., Dutta D.J., Deka B.C.: Macro and micro minerals in caprine follicular fluid. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 22, 23–25, 2001.
8. Bostancı M.S., Bayram M., Sevinç F.C., Pasaoglu H., Elbeg S.: The relationship between biochemical parameters, interleukin-6 and ovarian morphology in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical and Experimental Investigation*, 3, 307–312, 2012.
9. Braw-Tal R., Pen S., Roth Z.: Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology*, 72, 690–698, 2009.
10. Bristol-Gould S., Woodruff TK.: Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66, 5–13, 2006.
11. Bukovsky A., Caudle M.R.: Immune physiology of the mammalian ovary - a review. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59, 12–26, 2008.

12. Bukovsky A.: Immune system involvement in the regulation of ovarian function and augmentation of cancer. *Microscopy Research and Technique*, 69, 482-500, 2006.
13. Cech S., Doležel R.: Treatment of ovarian cysts in sows – a field trial. *Veterinarni Medicina*, 52, 413-418, 2007.
14. Cooper C.A., Moraes L.E., Murray J.D., Owens S.D.: Hematologic and biochemical reference intervals for specific pathogen free 6-week-old Hampshire-Yorkshire crossbred pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5, 1–5, 2014.
15. Crawford J.L., McNatty K.P.: The ratio of growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly coregulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348, 339–343, 2012.
16. Dalin A.M., Gidlund K., Eliasson-Selling L.: Post-mortem examination of genital organs from sows with reproductive disturbances in a sow-pool. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 38, 253–262, 1997.
17. De Buyscher E.V.: Immune regulation of the female reproductive tract. In: *Old Herborn University Seminar Monograph 12: Vaginal flora in health and disease*. Editors: Heidt P.J., Carter P.B., Rusch V., van der Waaij D. Herborn Litterae, Herborn-Dill, Germany, 15-25, 1999.
18. Dobrzański Z., Pogoda-Sewerniak K., Dragan S., Korniewicz D., Hoffmann K., Korniewicz A.: Effect of various feed phosphates on biochemical indices of blood and mineral composition of bones in finishing Pigs. *Acta Veterinaria Brno*, 79, 355–361, 2010.
19. Dubreuil P., Lapiere H.: Biochemistry reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61, 235–239, 1997.
20. Ebbert W., Bostedt H.: Cystic Degeneration in porcine ovaries – first communication: morphology of cystic ovaries, interpretation of the results. *Reproduction in Domestic Animals*, 28, 441-450, 1993.
21. Ebbert W., Elsaesser F., Bostedt H.: Cystic degeneration in porcine ovaries – second communication: concentrations of progesterone, estradiol-17b, and testosterone in cystic fluid and plasma; interpretation of the results. *Reproduction in Domestic Animals* 28, 451–463, 1993.
22. Firouzabadi R.D., Aflatoonian A., Modarresi S., Sekhvat L., MohammadTaheri S.: Therapeutic effects of calcium & vitamin D supplementation in women with PCOS. *Complementary Therapy in Clinical Practice*, 18, 85–88, 2012.
23. Fitko R., Kucharski J., Szlezyngier B.: The importance of thyroid hormone in experimental ovarian cyst formation in gilts. *Animal Reproduction Science*, 39, 159-168, 1995.
24. Fitko R., Kucharski J., Szlezyngier B., Jana B.: The concentration of GnRH in hypothalamus, LH and FSH in pituitary, LH, PRL and sex steroids in peripheral and ovarian venous plasma of hypo- and hyperthyroid, cysts-bearing gilts. *Animal Reproduction Science* 45, 123–138, 1996.

25. Fitzpatrick S.L., Sindoni D.M., Shughrue P.J., Lane M.V., Merchenthaler I.J., Frail D.E.: Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. *Endocrinology*, 139, 2571–2578, 1998.
26. Gregoraszczyk E.L., Skalka M.: Thyroid hormone as a regulator of basal and human chorionic gonadotrophin-stimulated steroidogenesis by cultured porcine theca and granulosa cells isolated at different stages of the follicular phase. *Reproduction, Fertility and Development*, 8, 961-971, 1996.
27. Gregoraszczyk E.L., Słomczynska M., Wilk R.: Thyroid hormone inhibits aromatase activity in porcine thecal cells cultured alone and in coculture with granulosa cells. *Thyroid*, 8, 1157-1163, 1998.
28. Harichandan P.P., Mohanty D.N., Das S., Patra B.K.: Hormonal and immunological studies in different trimester of pregnancy in cows. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 35, 42-44, 2014.
29. Heinonen M., Leppävuori A., Pyörälä S.: Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. *Animal Reproduction Science*, 52, 235–244, 1998.
30. Huang W.T., Lu S.G., Tang P.C., Wu S.C., Cheng S.P., Ju J.C.: Biochemical compositions of follicular fluid and the effects of culture conditions on the in vitro development of pig oocytes. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 15, 1403–1411, 2002.
31. Hussein A.M., Bourne F.J.: Immunoglobulin concentrations in pig follicular fluid. *International Journal of Fertility*, 29, 54-57, 1984.
32. Karveliėne B., Zilinskas H., Riskeviciėne V.: Post-mortem examination of sows genital organs culled for reproductive disturbances and immunohistochemical studies on ER $\alpha$  and PR A receptors in the anoestral sows uterus. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 275–281, 2007.
33. Khan F.A., Das G.K., Pande M., Pathak M.K., Sarkar M.: Biochemical and hormonal composition of follicular cysts in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science*, 124, 61-64, 2011.
34. Klem T.B., Bleken E., Morberg H., Thoresen S.I., Framstad T.: Hematologic and biochemical reference intervals for Norwegian crossbreed grower pigs. *Veterinary Clinical Pathology*, 39, 221- 226, 2010.
35. Knight P.G., Glister C.: TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132, 191-206, 2006.
36. Kor M.N., Khanghah M.K., Veisi A.: Follicular fluid concentrations of biochemical metabolites and trace minerals in relation to ovarian follicle size in dairy cows. *Annual Review & Research in Biology*, 3, 397–404, 2013.
37. Kor M.N., Moradi K.: A review of biochemical metabolites concentration and hormonal composition of ovarian follicular fluid in domestic animals. *Annual Review & Research in Biology*, 3, 246–255, 2013.

38. Kozłowska A., Wojtkiewicz J., Majewski M., Jana B.: The noradrenergic innervation and steroidogenic activity of porcine cystic ovaries. *Physiological Research*, 62, 421-433, 2013.
39. Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G., Van Soom A., Bols P.E., de Kruif A.: Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 80, 201–211, 2004.
40. Maruo T., Hayashi M., Matsuo H., Yamamoto T., Okada H., Mochizuki M.: The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 121, 1233-1241, 1987.
41. Maruo T., Hiramatsu S., Otani T., Hayashi M., Mochizuki M.: Increase in the expression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells early in follicular maturation. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 127, 152-160, 1992.
42. Mishra O.P., Pandey J.N., Gawande P.G.: Study on biochemical constituents of caprine ovarian follicular fluid after superovulation. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 16, 1711–1715, 2003.
43. Nandi S., Kumar V.G., Manjunatha B.M., Gupta P.S.: Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Development, Growth & Differentiation*, 49, 61–66, 2007.
44. Niswender G.D., Juengel J.L., Mcguire W.J., Belfiore C.J., Wiltbank M.C.: Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 50, 239-247, 1994.
45. Orisaka M., Jiang J.Y., Orisaka S., Kotsuji F., Tsang B.K.: Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by upregulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology*, 150, 2740–2748, 2009.
46. Pache T.D., Chadha S., Gooren L.J., Hop W.C., Jaarsma K.W., Dommerholt H.B., Fauser B.C.: Ovarian morphology in long-term androgen-treated female to male transsexuals. A human model for the study of polycystic ovarian syndrome? *Histopathology*, 19, 445-452, 1991.
47. Paradis F., Novak S., Murdoch G.K., Dyck M.K., Dixon W.T., Foxcroft GR.: Temporal regulation of BMP2, BMP6, BMP15, GDF9, BMPR1A, MPR1B, BMPR2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. *Reproduction (Cambridge, England)*, 138, 115–129, 2009.
48. Paulini F., Melo E.: The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 354–361, 2011.
49. Payan-Carreira R., Pires M.A.: Multiocyte follicles in domestic dogs: a survey of frequency of occurrence. *Theriogenology*, 69, 977-982, 2008.
50. Peng X., Yang M., Wang L., Tong C., Guo Z.: In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27, 247–257, 2010.



51. Prochazka R., Nemcova L., Nagyova E., Kanka J.: Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 71, 1290–1295, 2004.
52. Prvulović D., Jovanović-Galović A., Stanić B., Popović M., Grubor-Lajšić G.: Effects of a clinoptilolite supplement in pig diets on performance and serum parameters. *Czech Journal of Animal Science*, 52, 159–164, 2007.
53. Reibiger I., Spanel-Borowski K.: Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, 243-249, 2000.
54. Rodgers R.J., Irving-Rodgers H.F.: Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biology of Reproduction*, 82, 1021-1029, 2010.
55. Safran A., Reubinoff B.E., Porat-Katz A., Werner M., Friedler S., Lewin A.: Intracytoplasmic sperm injection allows fertilization and development of a chromosomally balanced embryo from a binoovular zona pellucida. *Human Reproduction*, 13, 2575-2578, 1998.
56. Schmidt A., Richter L., Weitze K.F.: Sonographische kontrolle von ovarzysten bei zuchtsauen. *Reproduction in Domestic Animals*, 31, (Suppl. 3), 80, 1995.
57. Sharma R.K., Vats R., Sawhney A.: Changes in electrolytes of antral follicles in goat. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 16, 18–21, 1995.
58. Siu M.K., Cheng C.Y.: The blood-follicle barrier (BFB) in disease and in ovarian function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 763, 186–192, 2012.
59. Solovyeva E.V., Hayashi M., Margi K., Barkats C., Klein C., Amsterdam A., Hsueh A.J., Tsafiri A.: Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of Reproduction*, 63, 1214–1218, 2000.
60. Stankiewicz T., Błaszczuk B., Udała J., Gączarzewicz D.: Zwyrodnienie cystowate jajników u świń. *Weterynaria w Terenie*, 2, 33-36, 2008.
61. Stankiewicz T., Błaszczuk B., Udała J.: A study on the occurrence of polyovular follicles in porcine ovaries with particular reference to intrafollicular hormone concentrations, quality of oocytes and their in vitro fertilization. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38, 233–239, 2009.
62. Stankiewicz T., Błaszczuk B., Udała J.: Wybrane aspekty dojrzewania oocytów świni w warunkach fizjologicznych i pozaustrojowych. *Medycyna Weterynaryjna*, 64, 400–403, 2008.
63. Stankiewicz T., Błaszczuk B., Lasota B., Gączarzewicz D., Udała J.: Saisonabhängige Veränderungen der Ovargröße sowie Konzentration von Steroidhormonen und Thyroxin in der Follikelflüssigkeit beim Schwein. *Tierärztliche Praxis Großtiere*, 36, 99-103, 2008.
64. Stankiewicz T., Błaszczuk B.: Concentrations of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in follicular cysts, mono- and polyoocyte follicles in gilts. *Acta Veterinaria-Beograd*, 64 (1), 24-32, 2014.
65. Stankiewicz T., Błaszczuk B.: Relationship between the concentration of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth differentiation factor-9 (GDF-9) in pre-ovulatory follicles, ovarian cysts, and serum in sows. *Animal Production Science*, 56, 141-146, 2016.

66. Su Y.Q., Sugiura K., Wigglesworth K., O'Brien M.J., Affourtit J.P., Pangas S.A., Matzuk M.M., Eppig J.J.: Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP-15 and GDF-9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135, 111–121, 2008.
67. Su Y.Q., Wu X., O'Brien M.J., Pendola F.L., Denegre J.N., Matzuk M.M., Eppig J.J.: Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte–cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte–granulosa cell regulatory loop. *Developmental Biology*, 276, 64–73, 2004.
68. Subha G.: Role of Biochemical factors and Mineral Supplementation in Livestock ration for Maintenance of their Fertility and Healthy Reproductive Status: A Review. *Research Journal of Chemical Science*, 3, 102–106, 2013.
69. Sun R.Z., Lei L., Cheng L., Jin Z.F., Zu S.J., Shan Z.Y., Wang Z.D., Zhang J.X., Liu Z.H.: Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. *Journal of Molecular Histology*, 41, 325–332, 2010.
70. Sun Y.L., Ping Z.G., Li C.J., Sun Y.F., Yi K.L., Chen L., Li X.Y., Wang X.L., Zhou X.: Comparative proteomic analysis of follicular fluids from normal and cystic follicles in sows. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 889–895, 2011.
71. Sun Y.L., Zhang J., Ping Z.G., Wang C.Q., Sun Y.F., Chen L., Li X.Y., Li C.J., Zhu X.L., Liu Z., Zhang W., Zhou X.: Relationship between apoptosis and proliferation in granulosa and theca cells of cystic follicles in sows. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 601–608, 2012.
72. Szulańczyk-Mencel K., Rząsa A., Bielas W.: Relationships between ovarian cysts and morphological and hormonal state of ovarian cortex in sows. *Animal Reproduction Science*, 121, 273–278, 2010.
73. Thangavel A., Nayeem M.: Studies on certain biochemical profile of the buffalo follicular fluid. *Indian of Veterinary Journal*, 81, 25–27, 2004.
74. Tummaruk P., Kesdangsakonwut S., Kunavongkrit A.: Relationships among specific reasons for culling, reproductive data, and gross morphology of the genital tracts in gilts culled due to reproductive failure in Thailand. *Theriogenology*, 71, 369–375, 2009.
75. Tummaruk P., Kesdangsakonwut S.: Factors affecting the incidence of cystic ovaries in replacement gilts. *Comparative Clinical Pathology*, 21, 1-7, 2012.
76. Winnicka A: Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2008.
77. Wira C., Kaushic C.: Mucosal immunity in the female reproductive tract: Effect of sex hormones on immune recognition and responses. In: *Mucosal Vaccines: New Trends in Immunization* (Kiyono H., Ogra P.L., McGhee J.R., Eds.), 375-388. Academic Press, New York, 1996.
78. Wira C.R., Kaushic C., Richardson J.: Role of sex hormones and cytokines in regulating the mucosal immune system in the female reproductive tract. In: *Mucosal Immunology* (Ogra, P.L. et al., Eds.), 1449-1461. Academic Press, San Diego, CA, 1999.

79. Yamada M., Hirakushi K., Inoue K., Horiuchi T., Sakai J., Okada T., Sugie I.: Magnesium as a regulator of thrombin formation in bovine ovarian follicular fluid. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 60, 837–842, 1998.
80. Zhou H., Ohno N., Terada N., Saitoh S., Naito I., Ohno S.: Permselectivity of blood follicle barriers in mouse ovaries of the mifepristone-induced polycystic ovary model revealed by in vivo cryotechnique. *Reproduction*, 136, 599–610, 2008.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych /artystycznych

### 5.1. Informacje ogólne o dorobku naukowo-publicacyjnym (bez publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy)

Efektom mojej dotychczasowej pracy badawczej jest współautorstwo 28 oryginalnych publikacji naukowych, z których 23 opublikowano po uzyskaniu stopnia naukowego doktora. Spośród 28 prac, 22 pozycje stanowią publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Pozostałe 6 oryginalnych prac zostało opublikowane w recenzowanych czasopismach krajowych. Jestem także współautorem 1 artykułu przeglądowego i 5 artykułów popularno-naukowych.

- Sumaryczny *impact factor* (IF) publikacji, liczony zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi **15,368**
- Łączna liczba punktów za publikacje wg wykazu czasopism naukowych MNiSW, liczona zgodnie z rokiem ich opublikowania, wynosi **469**, z czego **439** punktów przypada na okres po uzyskaniu stopnia doktora.
- Liczba cytowań publikacji wg bazy *Web of Science* wynosi **71**
- Index Hirscha opublikowanych publikacji wg bazy *Web of Science* wynosi **5**

Szczegółowy wykaz prac naukowych oraz informacje o współpracy naukowej i popularyzacji nauki zawarto w Załączniku nr 4.

## 5.2. Główne kierunki badawcze i ich omówienie

W mojej działalności naukowo-badawczej i publikacyjnej, związanej głównie z oceną przebiegu czynności rozrodczych samic i samców, wyróżnić można następujące kierunki badań:

- I. Folikulogeneza i jej zaburzenia, pozaustrojowe dojrzewanie i zapłodnienie oocytów
- II. Regulacja i monitorowanie procesów rozrodczych u samic i samców
- III. Sezonowość w rozrodzie zwierząt
- IV. Ocena wartości biologicznej nasienia samca
- V. Selen w organizmach zwierząt

### 5.2.1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

#### Ad. I. Folikulogeneza i jej zaburzenia, pozaustrojowe dojrzewanie i zapłodnienie oocytów

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w Załączniku 4. Jest to 7 oryginalnych prac twórczych (A2, A3, A9, A10, A21, B11), 2 prace przeglądowe (B6, C1), 1 praca popularnonaukowa (B7), 1 praca pełnotekstowa opublikowana w materiałach konferencji międzynarodowej (C2) i 11 doniesień konferencyjnych.

Realizując ten kierunek badawczy byłem głównym autorem cyklu doświadczeń nad określeniem potencjału rozrodczego pęcherzyków jajnikowych świni, oceną ich statusu hormonalnego i antyoksydacyjnego, a także zbadaniem jakości oocytów i możliwości ich zapłodnienia. **Rezultatem przeprowadzonych badań z tego zakresu było stwierdzenie występowania zjawiska pęcherzykowej polioocytowości w jajnikach świni.** Wykonano szereg preparatów histologicznych jajników i udokumentowano, że w jajnikach loszek i loch oprócz licznych pęcherzyków monocytowych znajdują się także pęcherzyki polioocytowe na różnych etapach folikulogenezy. **Niemniej jednak wykazano, że status hormonalny pęcherzyków polioocytowych różni się od pęcherzyków monocytowych.** W płynie pęcherzyków polioocytowych stężenie  $17\beta$ -estradiolu było istotnie wyższe, a progesteronu niższe niż w pęcherzykach monocytowych. Ponadto **stwierdzono różnice w jakości i wielkości**

**oocytów.** Przeprowadzając zapłodnienie *in vitro* **wykazano też niższą zdolność zapładniającą oocytów pozyskanych z pęcherzyków polioocytowych niż monoocytowych.** Niemniej jednak stwierdzono, że niektóre oocyty z pęcherzyków polioocytowych mają również zdolność do zapłodnienia *in vitro* i mogą osiągać stadium blastocysty.

Współuczestniczyłem też w badaniach nad jakością świńskich oocytów uwzględniając wiek i dojrzałość samic. W doświadczeniu tym **wykazano istotne różnice w parametrach morfometrycznych oocytów pozyskanych z jajników loszek i loch.**

O moim zainteresowaniu folikulogenezą i jej zaburzeniami u świń świadczy praca popularnonaukowa na temat zwyrodnienia cystowatego jajników świń. Jestem też głównym autorem pracy przeglądowej opublikowanej w recenzowanym czasopiśmie, w której przedstawiono specyfikę dojrzewania oocytów świńskich w warunkach fizjologicznych oraz problemy dotyczące dojrzewania tych gamet w warunkach pozaustrojowych.

W ramach omawianego obszaru badawczego prowadziłem także badania na pęcherzykach jajnikowych krowy. Już na początku swojej działalności naukowej współuczestniczyłem w pracach określających status steroidogeny i biochemiczny pęcherzyków jajnikowych w zależności od wielkości antralnych pęcherzyków jajnikowych. Wyniki tych doświadczeń są uzupełnieniem badań nad aktywnością sekrecyjną komórek pęcherzykowych, **a zależne od wielkości pęcherzyka jajnikowego różnice w stężeniu hormonów steroidowych i glukozy wskazują na potrzebę ich uwzględniania w procedurze dojrzewania oocytów *in vitro*.** W kolejnych pracach wykazano obecność wolnych frakcji jodotryronin w płynie bydłęczych pęcherzyków jajnikowych. Wyniki tego doświadczenia wskazują na udział jodotryronin w procesie folikulogenezy i sugerują istnienie związku między tymi hormonami a metabolizmem cholesterolu na poziomie pęcherzyka jajnikowego krowy.

Jednym z czynników, który zaburza prawidłową czynność jajnika są estrogeny środowiskowe. Blokują one receptory estrogenowe, działają hamująco na sekrecję estrogenów, zaburzają aktywność enzymów uczestniczących w steroidogenezie – co negatywnie odbija się na funkcjonowaniu całego układu rozrodczego samicy. Znany jest też negatywny wpływ estrogenów środowiskowych na czynność tarczycy. Stąd podejmowane są badania nad minimalizowaniem negatywnych skutków tych

związków. Dlatego też uczestniczyłem w badaniach, których celem było sprawdzenie czy suplementacja chitozanem, może zmniejszać wchłanianie i kumulację środowiskowych zanieczyszczeń rozpuszczalnych w tłuszczach, takich jak polichlorowane bifenylo (PCB), a tym samym minimalizować negatywne skutki ich oddziaływania. Badania te wykonane były na samicach myszy. Udokumentowano, że **zastosowane w doświadczeniu wskaźnikowe i dioksynopodobne polichlorowane bifenylo spowodowały istotny spadek stężenia 17 $\beta$ -estradiolu w osoczu krwi myszy. Niestety, suplementacja chitozanem nie zapobiegła temu obniżeniu.** Przeciwnie, stężenie 17 $\beta$ -estradiolu w osoczu krwi myszy, które otrzymały chitozan, było mniejsze w porównaniu z tymi, którym chitozanu nie podawano. Przepuszczalnie był to efekt hipocholesterolemicznego działania chitozanu prowadzącego do obniżenia stężenia cholesterolu będącego niezbędnym substratem do syntezy estradiolu. Jednakże suplementacja chitozanem wpłynęła na obniżenie kumulacji polichlorowanych bifenyli w wątrobie, woreczku żółciowym, tkance tłuszczowej, jelicie oraz wpłynęła na wzrost wydalania tych związków z kałem. Suplementacja chitozanem zapobiegła też obniżeniu stężenia wolnej trójiodotyroniny (FT<sub>3</sub>), co obserwowane było pod wpływem ekspozycji na PCB. **W podsumowaniu należy podkreślić, że suplementacja chitozanem, w warunkach określonego narażenia na PCB, może przyczynić się do ograniczenia ich kumulacji w poszczególnych narządach zwierząt doświadczalnych, głównie poprzez wzrost wydalania tych związków z kałem.** Efektem zainteresowania tymi zagadnieniami jest również praca o charakterze przeglądowym, której jest głównym autorem. W pracy tej przedstawiono aktualny stan wiedzy o wpływie estrogenów środowiskowych na przebieg procesów rozrodczych samic i samców.

Wyniki prowadzonych doświadczeń w zakresie omawianego obszaru badawczego zostały zasygnalizowane również na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych.

## Ad. II. Regulacja i monitorowanie procesów rozrodczych u samic i samców

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4. Jest to 6 oryginalnych prac twórczych (A4, A5, A15, A16, B10), 3 prace popularnonaukowe (B4, B5, B8), 2 doniesienia konferencyjne.

Realizując tę tematykę uczestniczyłem głównie w pracach dotyczących przebiegu i kontroli procesów rozrodczych kóz. Już w trakcie realizacji pracy

magisterskiej skupiłem się na problemach związanych z synchronizacją rui u tego gatunku. W prowadzonych badaniach oceniano zmiany hormonalne zachodzące nie tylko podczas synchronizowanej rui, ale także w cyklu posynchronizacyjnym. Przy zastosowaniu ingerencji hormonalnej ważnym jest bowiem nie tylko prawidłowy przebieg indukowanej owulacji, ale również uniknięcie negatywnych skutków ingerencji farmakologicznej. Moje zainteresowanie synchronizacją rui dotyczyły również krów. Aby zwrócić uwagę hodowcom i lekarzom weterynarii na problemy związane z synchronizacją rui u tego gatunku opublikowano artykuł popularnonaukowy.

Kolejne prace u kóz mają duże znaczenie diagnostyczne i praktyczne. W doświadczeniach, w których uczestniczyłem wykazano możliwość wykorzystania metody immunofluorescencyjnej jako metody alternatywnej do radioimmunologicznej w oznaczaniu progesteronu u kóz. **Wykazano też, że analiza zmian stężeń tego hormonu we krwi pozwala nie tylko na monitorowanie prawidłowego przebiegu cyklu jajnikowego, ale również może być pomocna w sygnalizowaniu obecności torbieli jajnikowych u tego gatunku. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują też na dużą wartość diagnostyczną ultrasonografii transrektalnej w kontroli cyklu jajnikowego kóz. Analiza obrazu ultrasonograficznego pozwoliła określić czas owulacji, czas trwania kolejnych faz cyklu jajnikowego, a także potwierdzić ewentualne stany patologiczne występujące na jajnikach. Dzięki temu możliwe jest wczesne wykrycie tych zaburzeń i podjęcie właściwego leczenia.**

W doświadczeniach przeprowadzonych u kóz badano też przydatność metody omometrycznej w monitorowaniu cyklu jajnikowego u tego gatunku zwierząt. Jest to bardzo prosta metoda, która stosowana jest w monitorowaniu cyklu rujowego - głównie u krów i suk. Jednakże badania dotyczące kóz są bardzo nieliczne i brak było jednoznacznych wyników potwierdzających możliwość zastosowania tej metody u tego gatunku zwierząt. Najprawdopodobniej trudności związane z uzyskaniem powtarzalnych i wiarygodnych wyników spowodowane są brakiem gruczołów przedstonkowych u kóz, co wiąże się z koniecznością głębszego wprowadzenia sondy (w pobliżu ujścia szyjki macicy). Nasze wstępne badania wykazały, że omometr przeznaczony przez producenta dla owiec i kóz wyposażony jest w sondę dopochwową o zbyt dużej średnicy (2,2 cm), co powodowało utrudnienia z wprowadzeniem takiej sondy na odpowiednią głębokość do pochwy kóz. Dlatego też na naszą prośbę producent zamontował sondę o znacznie mniejszej średnicy (0,8 cm). Pozwoliło to na

bezproblemowe, głębsze, a także bezstresowe dla zwierząt wprowadzenie sondy do pochwy. Zastosowana modyfikacja umożliwiła uzyskanie powtarzalnych odczytów, a uzyskane wyniki zostały potwierdzone zmianami w stężeniu progesteronu i objawami rujowymi. **Wyniki naszego doświadczenia wykazały, że pomiary oporności elektrycznej śluzu pochwowego, ale przy zastosowaniu sondy pomiarowej o mniejszej średnicy, mogą być użyteczne do monitorowania cyklu rujowego. Zgodnie z naszą wiedzą po raz pierwszy opisaliśmy też przydatność metody ometrycznej w sygnalizowaniu obecności torbieli jajnikowych, a także w określeniu długości trwania sezonu rozrodczego u kóz.**

Uczestniczyłem też w badaniach nad genetycznymi zaburzeniami związanymi z determinacją płci u kóz. W tym doświadczeniu określono profil ekspresji genów zaangażowanych w ten proces. Chciałem nadmienić, iż w trakcie realizacji procesów związanych z publikacją tych badań pełniłem funkcję autora korespondującego.

Byłem też współautorem pracy, w której określono i porównano profil ekspresji genu *SOX9* (SRY-box 9) w jądrach niedojrzałych i dojrzałych płciowo kozłów. W pracy tej wykazano, **że ekspresja genu *SOX9* zależy od wieku samców**. Ponadto, u samców z właściwie rozwiniętymi jądrami i prawidłowymi parametrami nasienia ekspresja *SOX-9* była istotnie wyższa niż u samców, u których stwierdzono nieprawidłowości w rozwoju jąder i spermatogenezie.

Obiektem mojego zainteresowania zagadnieniami związanymi z przebiegiem i monitorowaniem procesów rozrodczych są również inne gatunki zwierząt. Przykładem jest opublikowana ostatnio praca popularnonaukowa, w której przedstawiono możliwości wykorzystania ultrasonografii w położnictwie psów.

### Ad. III. Sezonowość w rozrodzie zwierząt

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4. Jest to 7 oryginalnych prac twórczych (A1, A3, A6, A7, A8, A21, B3), 1 praca popularnonaukowa (B9) i 2 doniesienia konferencyjne.

Sezonowość w rozrodzie występuje głównie u zwierząt wolno żyjących, a spośród gatunków gospodarskich najsilniej przejawia się u kóz i owiec. Dlatego też uczestniczyłem w badaniach prowadzonych na kozłach, u których wykazano zależne od pory roku zmiany w jakości nasienia, wielkości jąder i ich aktywności steroidogennej, a także stwierdzono wyraźny roczny rytm uwalniania hormonów tarczycy



z najwyższymi stężeniami w miesiącach, w których aktywność steroidogenna jąder i jakość nasienia była najniższa. Jednakże sezonowe zmiany w przebiegu procesów rozrodczych w mniejszym lub większym stopniu występują również u innych gatunków zwierząt. Przykładem jest świnia domowa, która nie jest typowym gatunkiem wykazującym sezonowość w rozrodzie. Niemniej jednak, większość parametrów rozrodu znacznie gorzej kształtuje się latem i wczesną jesienią, natomiast w okresie zimowo-wiosennym ulega poprawie. To sezonowe osłabienie aktywności rozrodczej zwanej „syndromem letniej niepłodności” zbiega się z sezonowym *anestrus* u przodka współczesnej świni, tj. dzika europejskiego. Efektem zainteresowania tym tematem była praca popularnonaukowa opublikowana w początkowym okresie mojej działalności naukowej. Z kolei efektem doświadczeń prowadzonych w zakresie sezonowości rozrodu u świń było wykazanie sezonowych różnic w wielkości jajników oraz koncentracji 17- $\beta$ -estradiolu, progesteronu, testosteronu i tyroksyny, a także aktywności peroksydazy glutationowej w płynie folikularnym. Uzyskane wyniki dowodzą, że status hormonalny i antyoksydacyjny pęcherzyka jajnikowego świni zależy nie tylko od stadium jego rozwoju, ale także od sezonu. Wskazano też, że sezonowy przebieg pęcherzykowej aktywności steroidogennej z większym jej nasileniem w okresie zimowym i mniejszym w okresie letnim powinien być uwzględniany w badaniach nad pozaustrojową „produkcją” zarodków, w których oocyty pozyskuje się z pęcherzyków jajnikowych w różnych porach roku. W aspekcie sezonowości rozrodu wykazano też sezonowe różnice w stężeniu wolnych frakcji jodotyronin oraz cholesterolu w płynie bydłłych pęcherzyków jajnikowych. U kłaczy natomiast stwierdzono zależne od sezonowych zmian w aktywności jajników różnice w składzie jonowym płynu pęcherzykowego.

Uczestniczyłem też w badaniach nad sezonowym przebiegiem procesów rozrodczych u jelenia szlachetnego, który z uwagi na silnie zaznaczoną sezonowość w rozrodzie jest cennym i bardzo interesującym obiektem badań w tym zakresie. W pracach tych skupiono się głównie na aktywności sekrecyjnej tarczycy i przytarczyc. W doświadczeniach na jeleniach wykazano, że niezależnie od dojrzałości płciowej i wieku występuje okoloroczny rytm uwalniania jodotyronin charakteryzujący się najwyższymi stężeniami w okresie zimowo-wiosennym i najniższymi w miesiącach letnio-jesiennych. Stwierdzono też różnice w intensywności uwalniania tyroksyny, kalcytoniny i parathormonu pomiędzy niedojrzałymi i dojrzałymi łaniami, co może wskazywać na udział tych hormonów w regulacji procesów związanych

z uzyskaniem dojrzałości płciowej. W cyklu doświadczeń na jeleniach wykazano także istnienie rocznego rytmu wydzielania kalcytoniny charakteryzującego się najwyższymi poziomami w okresie letnio-jesiennym i najniższymi w okresie zimowym. Wyniki te sugerują udział kalcytoniny w procesach życiowych zależnych od pór roku. We krwi samca jelenia stwierdzono ponadto zależność między sezonowymi zmianami w stężeniu mikro- i makroelementów a rocznymi zmianami w stężeniu testosteronu.

Oprócz ssaków sezonowość w rozrodzie występuje również u innych kręgowców, w tym u ptaków. Wiele badań w tym zakresie prowadzono u przepiórki japońskiej - czyniąc ją modelowym gatunkiem doświadczalnym w badaniach nad mechanizmami regulującymi sezonowe procesy rozrodcze. Dlatego w moim dorobku naukowym znajdują się też prace określające okołodobowy rytm uwalniania progesteronu i trójiodotyroniny, a także oceniające zmiany hormonalne zachodzące w czasie dojrzewania przepiórki japońskiej. Są to badania wprowadzające do dalszych prac nad poznaniem zależności między porą roku a procesami rozrodczymi ptaków.

#### Ad. IV. Ocena wartości biologicznej nasienia samca

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4. Jest to 6 oryginalnych prac twórczych (A12, A13, A14, B1, B2, B12), 1 praca popularnonaukowa (B5) i 8 doniesień konferencyjnych.

Jednym z głównych nurtów badawczych realizowanych od lat w mojej jednostce macierzystej jest poszukiwanie i doskonalenie metod oceny właściwości biologicznych plemników. Włączyłem się w ten nurt badawczy realizując prace nad wdrożeniem techniki podwójnego barwienia fluorescencyjnego jodkiem propidyny i SYBR-14 oraz test HOST (hypo-osmotic swelling test) w ocenie integralności strukturalnej i funkcjonalnej błony komórkowej plemników knura charakteryzującej się zwiększoną podatnością na uszkodzenia związane z procesami konserwacji. Na podstawie przeprowadzonych badań **stwierdzono przydatność wymienionych technik w diagnostyce seminologicznej nasienia knura**. Wykazano ponadto, że **utrata wartości biologicznej plemników przechowywanych długoterminowo w stanie płynnym może być związana z uszkodzeniami ich błony komórkowej na różnych etapach konserwacji**.

Oprócz oceny ruchliwości i stabilności środowiska plemników, a także integralności błony komórkowej plemnika szczególną uwagę zwrócono też na zmiany aktywności mitochondriów. W badaniach zastosowano barwienie kombinacją trzech fluorochromów – SYBR-14, PI oraz JC-1 (test SYBR-14/PI/JC-1) i cytochemiczny test skryningowy na oksydoreduktazy zależne od NADH (NADH-NBT). W wyniku realizacji tych badań stwierdzono też, że etap rozrzedzania nasienia oraz czas jego przechowywania w stanie płynnym mogą osłabiać zdolności oksydoredukcyjne mitochondriów plemników knura. Ponadto wykazano, że **temperatura i czas przechowywania mają istotny wpływ na aktywność mitochondriów plemników związaną z zaburzeniami ich potencjału błonowego**. Stwierdzono też, że przy wydłużaniu okresu przechowywania nasienia sukcesywnie nasila się depolaryzacja błon mitochondrialnych plemników, a działanie obniżonej temperatury (5 °C) może być dodatkowym czynnikiem istotnie wpływającym na tego typu zmiany.

Uczestniczyłem też w pracach, w których w ocenie aktywności mitochondriów plemnika wykorzystano metodę oksygraficzną. Metodę tę zastosowano do analizy metabolicznej mitochondrialnych enzymów oddechowych plemników w ejakulatach knurów różnych ras i w różnym wieku. **Uzyskane wyniki wykazały, że metoda oksygraficzna umożliwia precyzyjne badanie stanu układu oddechowego plemników i tym samym pozwala na selekcję osobników o najlepszych parametrach nasienia, z uwzględnieniem ich cech indywidualnych, rasy i wieku**. Zasugerowano możliwość zastosowania tej metody jako uzupełniającej w badaniach okresowych nasienia, a także przy podejmowaniu decyzji o eliminacji knura.

Jakość nasienia knura badano także w aspekcie zanieczyszczenia mikrobiologicznego. W tym celu przeprowadzono ilościową i jakościową ocenę zanieczyszczenia mikrobiologicznego ejakulatów knurów, a także nasienia przechowywanego w komercyjnym rozcieńczalniku X-cell® w temperaturze 16 °C. Określono też zależności zanieczyszczenia bakteryjnego z jakością przechowywanego nasienia, a także skuteczność działania antybiotyku (siarczanu gentamycyny) zawartego w rozcieńczalniku. Wykazano, że w ejakulatach knurów występował różny stopień i rodzaj zanieczyszczenia bakteryjnego. Najczęściej izolowanymi bakteriami były gronkowce i paciorkowce oraz niezidentyfikowane gatunki należące do rodzaju *Pseudomonas*. W trakcie przechowywania nasienia zanotowano redukcję wzrostu bakterii Gram-ujemnych, z wyjątkiem *Pseudomonas* spp., przy ograniczeniu inhibicji wzrostu bakterii Gram-dodatnich. Selektywny wzrost poszczególnych typów bakterii w

czasie konserwacji mógł wynikać z właściwości siarczanu gentamycyny, który wykazuje większą skuteczność wobec bakterii Gram-ujemnych. Szkodliwy wpływ niektórych bakterii związany był z ich adhezją do powierzchni wszystkich regionów morfologicznych plemnika, a towarzysząca im wzmożona aglutynacja plemników nasilała się wraz z wydłużaniem czasu przechowywania. **Przeprowadzone badania sugerują, że oprócz stosowania wysokich standardów higienicznych przy produkcji nasienia, należy zwracać uwagę na dobór właściwego pod względem skuteczności działania przeciwbakteryjnego rozcieńczalnika, który powinien być dostosowywany do profilu zanieczyszczenia bakteryjnego nasienia danej populacji knurów.**

W ramach badań nad czynnikami kształtującymi właściwości biologiczne nasienia knura wykazano, że genotyp oraz wiek samca mogą być czynnikami znacząco różnicującymi i wpływającymi na jakość ich nasienia. Stwierdzono również, że przy zachowaniu właściwych warunków utrzymania możliwe jest uzyskanie dobrej jakości nasienia i jednocześnie utrzymanie prawidłowych przyrostów i mięsności.

W zakresie omawianego obszaru badawczego uczestniczyłem też w badaniach nad szczegółową analizą obrazu morfologicznego plemników knurów. Najczęściej występującymi wadami głównymi były kropla cytoplazmy w położeniu proksymalnym, a także niby-kropla w obrębie wstawki oraz zwężenie u podstawy główki plemnika. Dominującymi wadami podrzędnymi były natomiast kropla cytoplazmy w położeniu dystalnym oraz pojedyncza pętla wówki plemnika. Występowanie tych wad może wynikać z krótszego czasu dojrzewania plemników w najądrzu. **Dlatego też zasugerowano, że przyczyną wad plemników może być nadmierna eksploatacja rozplodowa niektórych, a zwłaszcza starszych knurów.**

Wyniki prowadzonych doświadczeń opublikowano w oryginalnych pracach twórczych, a także zostały też zasygnalizowane na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych. Jestem też współautorem pracy popularnonaukowej opisującej znaczenie inseminacji w rozrodzie trzody chlewnej.

#### Ad. V. Selen w organizmach zwierząt

Prace dotyczące tego zagadnienia wykazano w załączniku 4. Jest to 5 oryginalnych prac twórczych (A11, A17, A18, A19, A20) i 4 doniesienia konferencyjne.

W moim dorobku naukowym wiele prac poświęcono znaczeniu jodotyronin w procesach rozrodczych. Ich rolę uwzględniano zarówno w procesach związanych z sezonowością w rozrodzie, jak i w procesach zachodzących na poziomie jajnika. Z uwagi na fakt, że synteza i metabolizm tych hormonów w dużym stopniu zależy od enzymów selenozależnych, podjęto badania nad określeniem zawartości selenu (Se) u zwierząt hodowlanych i wolno żyjących z terenu Pomorza Zachodniego.

**W większości przypadków w tkankach badanych zwierząt obserwowano niedoborowe bądź marginalne stężenie selenu. Dotyczyło to lisów, koni, koźląt i owiec. Marginalne stężenie selenu stwierdzono także w surowicy koników polskich utrzymywanych przez cały rok na terenie Parku Natury Zalewu Szczecińskiego.**

W badaniach tych wykazano, że płeć i wiek zwierząt nie wpływa na stężenie selenu w surowicy. Odnotowano natomiast różnice w zawartości selenu i aktywności GSHPx w tkance jądrowej między ogierkami a ogierami, co może sugerować związek tych parametrów z procesami zależnymi od dojrzałości płciowej.

Stałe monitorowanie stężenia selenu jest ważne, ponieważ pozwala hodowcom kontrolować stopień pokrycia zapotrzebowania zwierząt na ten mikroelement. Uzupełnianie niedoborów selenu zapobiega wielu schorzeniom, takich jak zatrzymanie łożyska i mastitis. Ponadto stężenie selenu w tkankach zwierząt przekłada się na zawartość tego pierwiastka w produktach od nich otrzymywanych. Optymalne stężenie selenu w tkankach poszczególnych gatunków zwierząt można osiągnąć poprzez zastosowanie odpowiednich programów profilaktycznych. W prowadzonych w tym zakresie badaniach **wykazano, że właściwe zaopatrzenie zwierząt w selen w formie np. dodatku do paszy (drożdże selenowe) wpływa na poprawę opłacalności chowu i hodowli zwierząt. U owiec w wyniku zastosowania dodatku selenu stwierdzono mniejszą śmiertelność wśród jagniąt i większą masę urodzeniową, a także poprawę parametrów reprodukcyjnych, tj. płodności i plenności.**

Tomasz Stankiewicz