
ZAŁĄCZNIK III

AUTOREFERAT

(OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH)

dr inż. Joanna Kochan

Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wrocław 2023

Spis treści	Strona
1. Dane personalne.	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.	4
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	21
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	27
7. Pozostałe informacje o kandydacie, dotyczące jego kariery zawodowej.	29

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: Joanna Kochan

Data urodzenia:

Miejsce urodzenia:

Miejsce pracy: Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
al. Adama Mickiewicza 21
31-120 Kraków

Dane kontaktowe: Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
al. Adama Mickiewicza 24/28
tel. 506 949 079, e-mail: joanna.kochan@urk.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 09.12.2009 Doktor nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika.
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Badanie in vitro zdolności rozwojowych oocytów klaczy po mikroiniekcji plemnika i aktywacji partenogenetycznej.*”
Promotor: prof. dr hab. Marian Tischner
- 13.07.2004 Magister inżynier zootechniki w zakresie biologii rozrodu zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie,
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Tytuł pracy magisterskiej: „*Próba oceny hodowli klusaków na terenie Polski.*”
Promotor: prof. dr hab. Maria Kulisa
-

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2010-2012** Asystent w Katedrze Rozrodu i Anatomii Zwierząt (obecna nazwa Katedry: Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt), Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.
- 2012-2019** Adiunkt naukowo-dydaktyczny w Katedrze Rozrodu i Anatomii Zwierząt (obecna nazwa Katedry: Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt), Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.
- 2019-2022** Adiunkt naukowo-badawczy w Katedrze Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Od 09.2022

Profesor Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, w Katedrze Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku -Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz. U. 2018, poz. 1668).

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl czterech, powiązanych tematycznie, oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Łączna wartość punktowa poniższych publikacji wynosi 355 punktów wg kryteriów Ministra Edukacji i Nauki zgodnie z rokiem ich wydania (382 pkt po zastosowania przelicznika dla prac wydanych po 2018 roku). Sumaryczny Impact Factor publikacji wg listy JCR wynosi 10.663.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Analiza czynników wpływających na efektywność hodowli in vitro zarodków kota domowego (Felis catus)

b) Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia (autorzy, rok wydania, tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa)

Wartości punktowe MEiN oraz wartości wskaźników IF (Impact Factor wg listy Journal Citation Reports - JCR)

Lp.	Publikacja	IF	Pkt MEiN
P-1	Kochan J* , Nowak A, Kij B., Fryc K., Prochowska S., Nizański W. A comparison of in vitro culture systems for cat embryos. <i>Theriogenology</i> 2022 , 178, 149–154. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.10.026	2,923	140
P-2	Kochan J* , Nowak A., Młodawska W., Prochowska S., Partyka A., Skotnicki J., Nizański W. Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes obtained from prepubertal and adult domestic and wild cats. <i>Animals</i> 2021 , 11, 1-11. doi: 10.3390/ani11010020	3.231	100
P-3	Kochan J* , Nowak, A., Kij, B., Prochowska, S., Nizański, W. Analysis of morphokinetic parameters of feline embryos using a time-lapse system. <i>Animals</i> 2021 , 11(3), 1–10, 748. doi:10.3390/ani11030748	3.231	100
P-4	Kochan J. , Nowak A., Nizański W., Prochowska S., Migdał A., Młodawska W., Partyka A., Witkowski M. Developmental competence of cat (<i>Felis domesticus</i>) oocytes and embryos after parthenogenetic stimulation using different methods. <i>Zygote</i> . 2018 , 22, 1-8. doi: 10.1017/S0967199418000011	1,278	15 42**
	Razem	10.663	355 382**

poszczególnych prac podano zgodnie z rokiem wydania publikacji.

* autor korespondencyjny, **suma punktów po zastosowaniu przelicznika (2,8) dla prac wydanych przed 2019r.

Publikacje będące podstawą osiągnięcia naukowego oraz oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych (P1-P4) wykazano w załączniku nr V.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

Wszystkie gatunki kotowatych poza kotem domowym są zagrożone wyginięciem, a ich ochrona wymaga wspólnych wysiłków naukowców reprezentujących różne dziedziny nauki w zakresie ochrony *in situ* i *ex situ*. Podstawą nowoczesnych programów ochrony *ex situ* zagrożonych gatunków są szeroko pojęte techniki wspomaganego rozrodu (ART-*assisted reproduction techniques*) takie jak; inseminacja, zapłodnienie *in vitro* (IVF- *in vitro fertilisation*) czy klonowanie (SCNT – *somatic cell nuclear transfer*), oraz zabezpieczanie rezerwy genetycznej poprzez tworzenie banków genów. Postęp w rozwoju tych metod zależy od dostępności gamet; plemników i oocytów. Z drugiej strony, dostęp do gamet kota domowego jest nieograniczony, ze względu na powszechność zabiegów gonadektomii przeprowadzanych w większości lecznic weterynaryjnych. Dlatego też, kot domowy stał się modelem badawczym dla dzikich kotowatych, a większość procedur wspomaganego rozrodu jest testowana z wykorzystaniem gamet kotów domowych.

Pierwsze kocięta po zapłodnieniu *in vitro* (IVF) oocytów dojrzewających *in vivo*, przyszły na świat w 1988 [Goodrowe i wsp. 1988]. Prawie dekadę zajęło naukowcom uzyskanie kociąt po zapłodnieniu oocytów dojrzewających *in vitro* [Pope i wsp. 1997], a w 2000 [Shin i wsp. 2002] udało się sklonować kota domowego. Od tamtej pory dzięki wieloletnim badaniom udało się wdrożyć protokoły pozaustrojowej produkcji zarodków do ochrony dzikich kotowatych i uzyskać potomstwo od: tygrysa (IVF), lwa, kotka cętkowanego (IVF), karakala (IVF), serwala (IVF), kota czarnołapego (IVF), kota nubijskiego (IVF, SCNT) i kota pustynnego (SCNT) [Donoghue i wsp. 1990, Gomez i wsp. 2004, 2008, Pope i wsp. 1993, 2006a, 2006b, 2012].

Pomimo wspomnianych sukcesów, wyniki hodowli zarodków kocich *in vitro* nie są satysfakcjonujące. W wyniku klasycznego zapłodnienia *in vitro* (IFV) uzyskuje się średnio 50% dzielących się zarodków, z czego tylko około 20% rozwija się do stadium blastocysty.

Jednym z największych problemów u kotowatych jest słaba efektywność dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro* oraz ich ograniczona zdolność do rozwoju do stadium blastocysty po zapłodnieniu *in vitro*. Dodatkowo, czynnikiem ograniczającym efektywność zapłodnienia *in vitro* u kotów jest zróżnicowana morfologicznie pula oocytów. U kotowatych występują oocyty z ciemną cytoplazmą jednorodną i mozaikowatą oraz z jasną cytoplazmą [Wood & Wildt 1997]. Barwa oocytów jest uwarunkowana ilością lipidów, a oocyty z jasną cytoplazmą nie posiadają zdolności do dojrzewania *in vitro* (IVM-*in vitro maturation*) i zapłodnienia. Kolejnym problemem w hodowli *in vitro* zarodków kotowatych jest tzw. "blok moruli" (*morula block*), czyli zatrzymanie rozwoju zarodków w stadium moruli. Z powodu bloku rozwojowego tylko

ok 20% zarodków kontynuuje rozwój do stadium blastocysty (Roth i wsp. 1994). Bloki rozwojowe zarodków (*cleavage-block*) w hodowlach *in vitro* nie są charakterystyczne jedynie dla kotowatych, występują u większości gatunków i mają związek z aktywacją genomu zarodka. U gatunków takich jak: myszy, bydło, owce, świnie blok rozwojowy występuje znacznie wcześniej, na etapie kilku blastomerów i nie powoduje tak dużych strat w hodowli *in vitro* jak u kotowatych (Nanogaki i wsp. 1994, Meirelles i wsp. 2006). Ponadto istnieje duża dysproporcja w liczbie zespołów badawczych zajmujących się technikami wspomaganego rozrodu u kotowatych, a co za tym idzie liczbą publikacji, w porównaniu do innych gatunków zwierząt; hodowlanych (bydło, owce, świnie) czy laboratoryjnych [Pope i wsp. 2006]. Zaledwie kilka wiodących zespołów na świecie posiada kolonię kotów, która umożliwia transfery zarodków i uzyskanie potomstwa w wyniku zapłodnienia *in vitro* czy klonowania. Wszystko to powoduje bardzo wolny postęp w badaniach dotyczących embriologii eksperymentalnej u kotowatych.

W przypadku dzikich kotowatych, uzyskanie blastocysty *in vitro* jest znacznie trudniejsze niż u kotów domowych w związku z niewielką liczbą oocytów oraz ich słabą jakością i zdolnością rozwojową. Jajniki samic dzikich kotowatych często pozyskiwane są *post-mortem* od samic chorych, starych lub padłych w nagłych wypadkach i transportowane przez wiele godzin do laboratorium, co obniża znacząco kompetencje rozwojowe oocytów. W takich przypadkach, idealnym byłoby dysponowanie optymalnymi, ujednoczonymi protokołami laboratoryjnymi stosowanymi do dojrzewania *in vitro* oocytów (IVM), zapłodnienia *in vitro* (IVF) i hodowli zarodków. Niestety każde laboratorium stosuje swoje własne protokoły, przez co uzyskuje różne, trudne do porównania wyniki. W ostatnich latach pierwszym krokiem do ujednoczenia i poprawy efektywności procedur pozaustrojowej produkcji zarodków stosowanych u kotowatych zaczęło być stosowanie między innymi przez nasz zespół komercyjnych pożywek, które dały bardzo dobre wyniki [Alam i wsp. 2019, Prochowska i wsp. 2019, Kij i wsp. 2019]. Jednakże nadal nie ma jednoznacznych rekomendacji dotyczących systemu hodowli zarodków i wciąż trwają badania nad poprawą wskaźników dojrzewania *in vitro*, zapłodnienia oraz rozwoju zarodków.

W związku z tym przeprowadzono kompleksowe badania, których celem była analiza czynników wpływających na potencjał rozwojowy zarodków kota domowego (*Felis catus*) w warunkach *in vitro* i próba ustalenia optymalnych warunków hodowli *in vitro* zarodków. Wyniki badań przedstawiono w cyklu czterech publikacji, stanowiących osiągnięcie naukowe o tytule:

Analiza czynników wpływających na efektywność hodowli in vitro zarodków kota domowego (Felis catus)

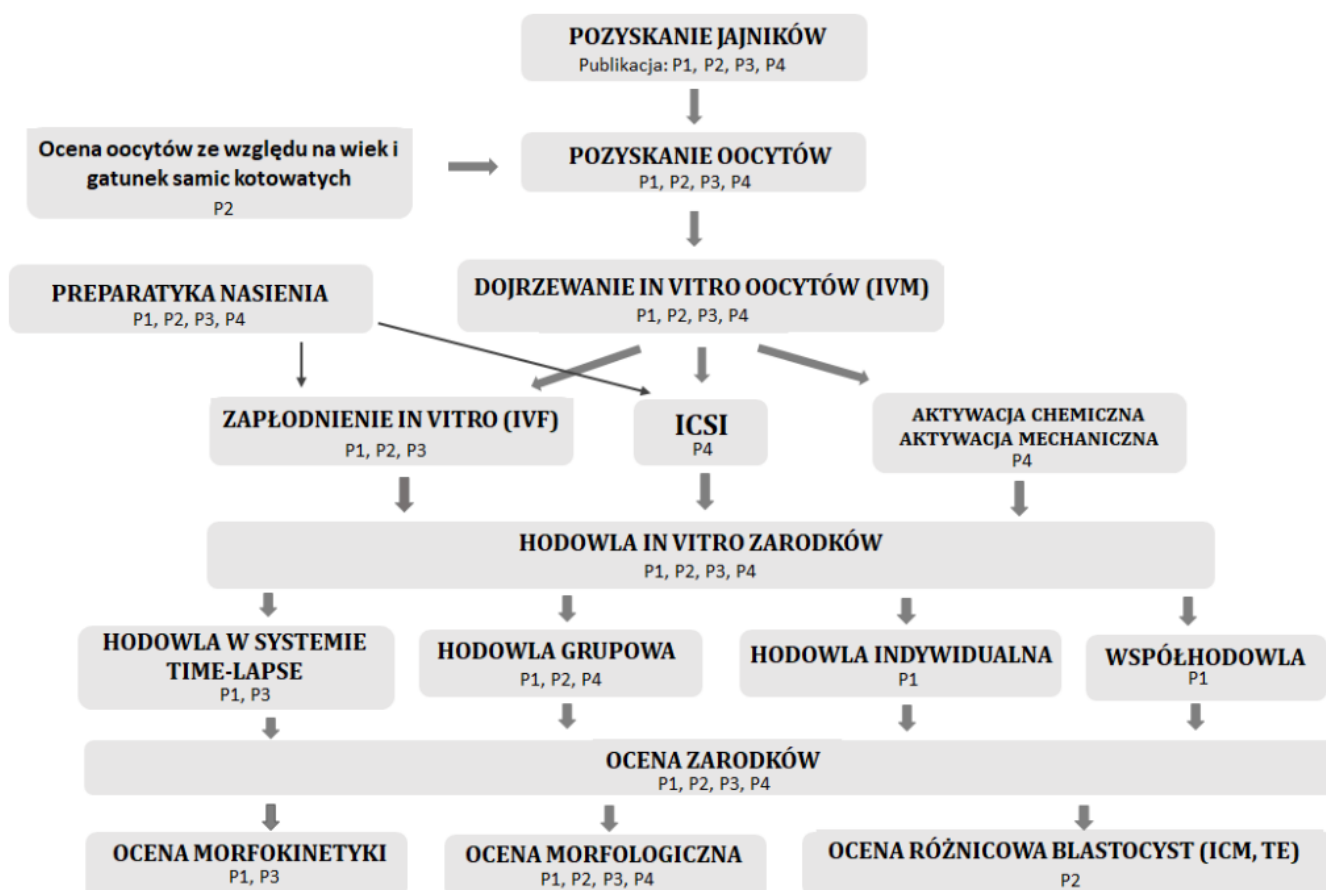
Cele szczegółowe, realizowane w kolejnych publikacjach, obejmowały:

1. Porównanie kilku systemów hodowli *in vitro* zarodków kota domowego i wskazanie najbardziej efektywnego (P-1).

2. Określenie wpływu wieku dawczyni na morfologię i kompetencje rozwojowe oocytów oraz jakość blastocyst kota domowego (P-2).
3. Porównanie morfologii oraz zdolności do dojrzewania *in vitro* oocytów kota domowego i dzikich kotowatych w kontekście wykorzystania kota domowego jako modelu badawczego dla dzikich kotowatych (P-2).
4. Analizę parametrów morfokinetycznych oraz ich związek z potencjałem rozwojowym zarodków kota domowego w warunkach *in vitro* (P-3).
5. Określenie częstotliwości wzbudzenia aktywacji oocytów i rozwoju partenogenetycznego zarodków na różnych etapach procedury zapłodnienia *in vitro* u kota domowego (P-4).

Metody badawcze

W trakcie realizacji badań wykorzystano poniższe techniki i metody badawcze;



Ryc.1. Metody badawcze wykorzystane w publikacjach P1, P2, P3, P4.

Omówienie głównych wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe**P-1**

Kochan J*, Nowak A, Kij B., Fryc K., Prochowska S., Nizański W.
A comparison of in vitro culture systems for cat embryos.
Theriogenology 2022, 178, 149–154.

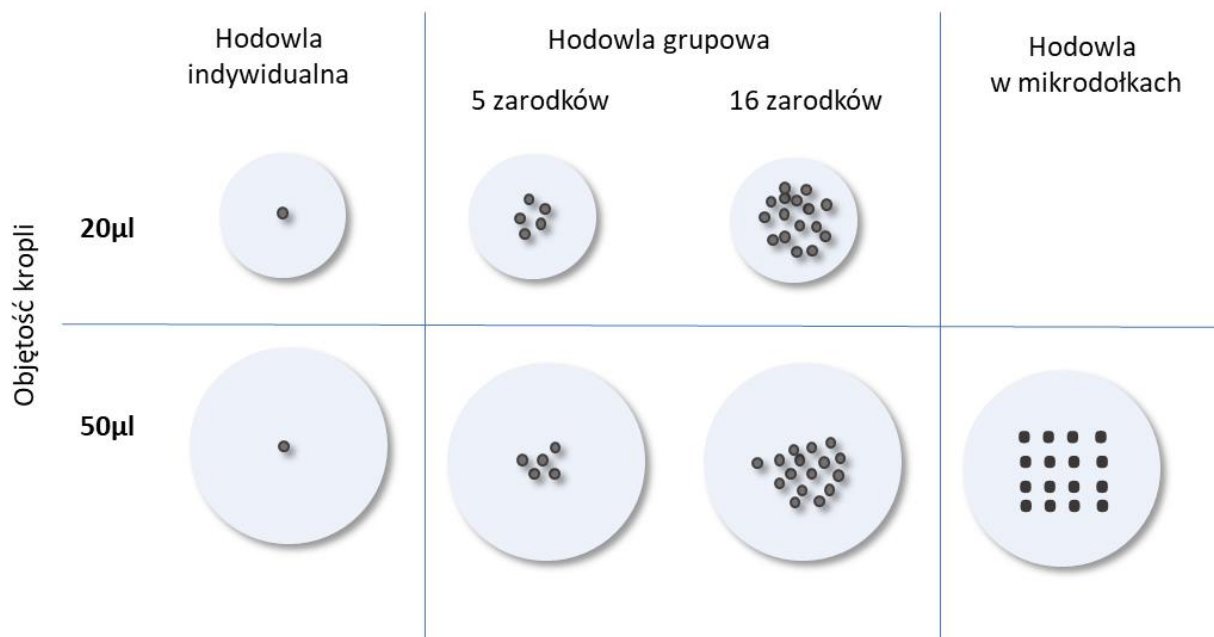
Efektywność hodowli *in vitro* zarodków zależy od wielu czynników takich jak; pożywka hodowlana, temperatura, wielkość kropli hodowlanej, zagęszczenie zarodków, jakość zarodków towarzyszących, rodzaj szalki. W przypadku zarodków kocich nie ma jednoznacznych rekomendacji dotyczących metod hodowli *in vitro* i dotychczas nie wskazano najbardziej optymalnego systemu. Różni autorzy hodują zarodki kocie w różnych mediach hodowlanych, indywidualnie lub grupowo w różnym zagęszczeniu i w różnej objętości pożywki (20 µL, 50 µL, 100 µL, 500 µL), [Godroowe i wsp. 1988, Prochowska i wsp. 2019, Gomez i wsp. 2003, 2004, Kochan i wsp. 2018]. Główną zaletą hodowli grupowej jest wydzielanie czynników wzrostu i wzajemna stymulacja do rozwoju przez zarodki towarzyszące, ale pod warunkiem że są one dobrej jakości. Natomiast zaletą hodowli indywidualnej jest możliwość dokładnego monitorowania pojedynczych zarodków i precyzyjna selekcja zarodków do embriotransferu. Kompromisem pomiędzy hodowlą grupową i indywidualną może być system hodowli zarodków „WOW” (*well-of-well*) w którym zarodki umieszczone są oddzielnie w mikrodołkach, co umożliwia precyzyjną ich identyfikację ale jednocześnie przykryte wspólną kroplą pożywki hodowlanej, dzięki czemu dzielą wspólne środowisko hodowlane. Obecnie na rynku istnieje wiele szalek komercyjnych, opartych na metodzie WOW, dedykowanych do systemów monitorowania zarodków „time-lapse” np. szalki Primo Vision®, Embryoscope®, Miri®, Geri®. Szalki te można z powodzeniem stosować również w laboratoriach, które nie posiadają drogiego systemu time-lapse.

Hodowla *in vitro* bardzo cennych pojedynczych zarodków lub zarodków gorszej jakości może być wspomagana przez współhodowle z zarodkami dobrej jakości tego samego (homospecific) lub innego (heterospecific) bardziej dostępnego gatunku. W przypadku kota domowego istnieją tylko dwa doniesienia o współhodowli zarodków kocich z zarodkami tego samego gatunku oraz współhodowli z zarodkami mysimi lub bydłęcymi w podobnym stadium rozwojowym [Spindler i wsp. 2002, 2006]. We wspomnianych badaniach do współhodowli wykorzystano specjalnie zaprojektowaną na potrzeby doświadczenia, niedostępną komercyjnie szalkę z nylonową membraną oddzielającą zarodki fizycznie ale umożliwiającą przenikanie pożywki hodowlanej. Natomiast szalki WOW wydają się być dobrą alternatywą do prowadzenia współhodowli, gdyż zarodki pozostają odseparowane fizycznie z zachowaniem komunikacji chemicznej.

Celem badań było:

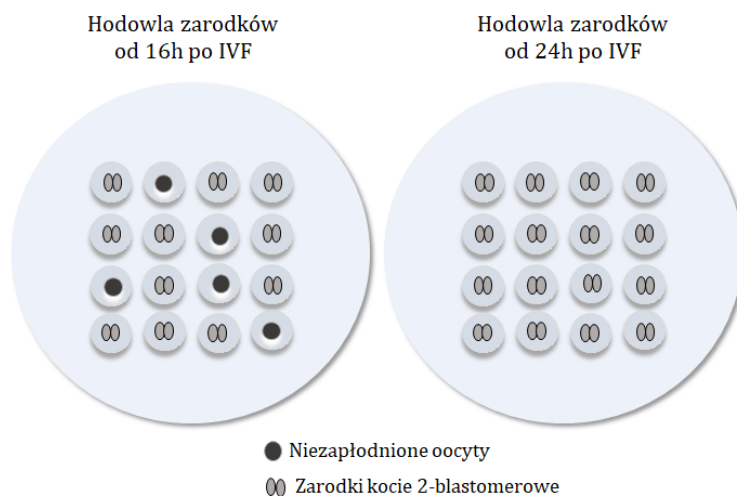
- a) Porównanie kilku systemów hodowli zarodków kocich; indywidualnie, grupowo i w szalkach WOW- Primo Vision®, w różnej objętości pożywki hodowlanej i różnym zagęszczeniu zarodków (Ryc.2).

Ryc. 2. Porównywane systemy hodowli zarodków kocich.



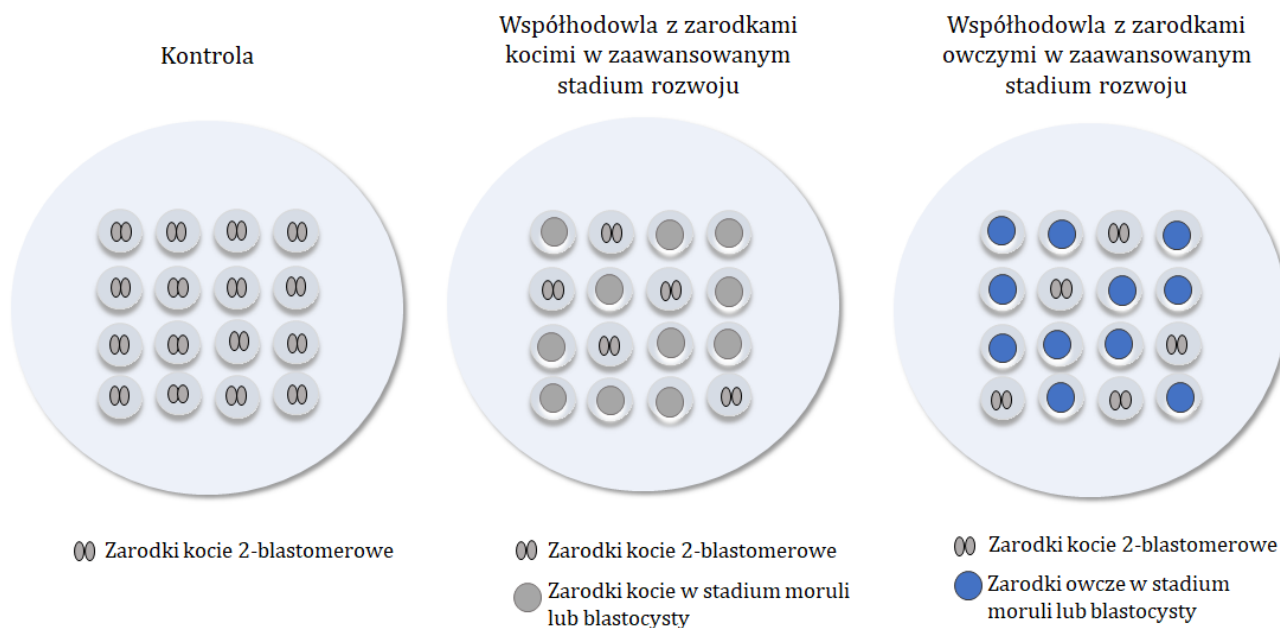
- b) Określenie wpływu niezapłodnionych oocytów na rozwój zarodków we wspólnej hodowli *in vitro* w szalkach Primo Vision®. W badaniu porównano wyniki hodowli przypuszczalnych zygot od 16 godziny po zapłodnieniu, gdzie w szalce znajdowały się również niezapłodnione oocyty oraz hodowli zarodków od 24 godziny po IVF, gdzie w szalce umieszczono jedynie dzielące się zarodki 2 blastomerowe (Ryc.2).

Ryc.3. Porównywany czas rozpoczęcia hodowli *in vitro* zarodków kocich.



- c) Analiza potencjału rozwojowego zarodków kocich we współhodowli z zarodkami towarzyszącymi tego samego gatunku, w zaawansowanych stadiach rozwojowych (morula/blastocysta).
- d) Analiza potencjału rozwojowego zarodków kocich we współhodowli z towarzyszącymi zarodkami owczymi w zaawansowanych stadiach rozwojowych (morula/blastocysta).

Ryc. 4. Porównywane metody współhodowli zarodków kocich.



Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano następujące wyniki;

- a) Najwyższy odsetek blastocyst i wyklutych blastocyst uzyskano w hodowli zarodków w szalkach WOW- Primo Vision® (16 mikrodołków pod 50 ml pożywki hodowlanej) w porównaniu do hodowli indywidualnej ($p < 0.001$) i grupowej ($p < 0.05$). Nie stwierdzono zależności w hodowli grupowej pomiędzy objętością kropli (20 μL vs. 50 μL) i zagęszczeniem zarodków (5 vs. 16), a odsetkiem blastocyst. Stwierdzono natomiast obniżenie zdolności do wykluwania się blastocyst przy największym zagęszczeniu w najmniejszej objętości pożywki (16 zarodków/20 μl)
- b) Nie odnotowano wpływu niezapłodnionych oocytów na potencjał rozwojowy zarodków podczas wspólnej hodowli *in vitro*. Nie stwierdzono również statystycznych różnic w czasie formowania się blastocyst we współhodowli z niezapłodnionymi oocytami (od 16hpi) w stosunku do hodowli samych zarodków od 24 hpi.

- c) Współhodowla zarodków kocich z towarzyszącymi zarodkami kocimi w zaawansowanych stadiach rozwojowych nie wpłynęła na odsetek blastocyst, ale znacząco poprawiła wskaźnik wykuwania się blastocyst w stosunku do grupy kontrolnej (20 vs. 12%), ($p < 0.05$). Współhodowla nie wpływała na czas powstawania blastocysty.
- d) Współhodowla zarodków kocich ze starszymi zarodkami owczymi zwiększyła odsetek blastocyst (54 vs. 37%), ($p < 0.05$) jak i wykluwających się blastocyst w stosunku do grupy kontrolnej (22 vs. 12%), ($p < 0.05$). Blastocysty kocie formowały się średnio 10h szybciej we współhodowli z zarodkami owczymi w stosunku do grupy kontrolnej.

Wnioski i znaczenie badań

Szalki „well of well” łączą zalety indywidualnej i grupowej hodowli zarodków i pozwalają osiągnąć wyższe wskaźniki rozwojowe (odsetek morul, blastocyst, wykluwających się blastocyst) zarodków kocich w porównaniu z innymi testowanymi systemami. Komercyjne szalki dedykowane do systemów time-lapse jak np. szalki Primo Vision® mogą być stosowane bez systemu time-lapse w zwykłych inkubatorach do hodowli zarodków. Ponadto, szalki w systemie WOW pozwalają prowadzić współhodowle z innymi zarodkami, zapewniają ich odseparowanie przy jednoczesnym zachowaniu wspólnego środowiska hodowlanego. Wyniki doświadczenia są istotne w kontekście hodowli *in vitro* cennych zarodków gatunków dzikich kotowatych zagrożonych wyginięciem, które często są gorszej jakości ze względu na status zdrowotny lub wiek dawczyni oocytów. Rozwój takich zarodków można wspierać poprzez współhodowle z dobrej jakości zarodkami kota domowego lub zarodkami innych gatunków. Ponadto wykazano że obecność niezapłodnionych, potencjalnie degenerujących oocytów w hodowli zarodków nie wpływa na potencjał rozwojowy zarodków i dlatego możliwe jest rozpoczęcie hodowli przypuszczalnych zygot od 16 h po IVF lub podzielonych zarodków od 24h. Jest to istotne ze względu na organizację pracy w laboratorium.

P-2

Kochan J*, Nowak A., Młodawska W., Prochowska S., Partyka A., Skotnicki J., Niżański W.
Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes obtained from prepubertal and adult domestic and wild cats.
Animals 2021, 11, 1-11.

Ze względu na wysoką śmiertelność noworodków i młodych kociąt dzikich kotowatych, zarówno żyjących na wolności, jak i utrzymywanych w ogrodach zoologicznych, istnieje możliwość pozyskiwania od tych zwierząt oocytów i wykorzystywania ich w procedurach wspomaganego rozrodu lub przechowywania w bankach komórek. U kotowatych występuje zróżnicowana pula oocytów; oocyty z ciemną cytoplazmą jednorodną lub mozaikową oraz z jasną cytoplazmą (Wood i Wildt, 1997). Barwa oocytów jest uwarunkowana ilością lipidów, a oocyty z jasną cytoplazmą nie

posiadają zdolności do dojrzewania *in vitro* (IVM-*in vitro maturation*) i zapłodnienia. Tak więc, pula oocytów możliwych do wykorzystania do zapłodnienia *in vitro* jest pomniejszona o liczbę oocytów z jasną cytoplazmą, co ogranicza znacząco wydajność technik pozaustrojowej produkcji zarodków. Dotychczas nie określono udziału oocytów o jasnej i ciemnej cytoplazmie w populacji oocytów niedojrzałych płciowo kotek w stosunku do kotek w wieku rozrodczym. Nie porównano również zróżnicowania populacji oocytów pomiędzy kotem domowym, a różnymi gatunkami dzikich kotowatych. Badanie zdolności rozwojowych oocytów pochodzących od niedojrzałych płciowo samic było przedmiotem wielu badań u ludzi, zwierząt laboratoryjnych i hodowlanych. Część autorów wskazuje na niższy potencjał rozwojowy oocytów pochodzących od niedojrzałych płciowo samic [Morton 2008, Leoni i wsp. 2015], podczas gdy inni donoszą o uzyskaniu zarodków dobrej jakości i urodzeniu zdrowego potomstwa [Armstrong i wsp. 1992, Ptak i wsp. 1999]. W dostępnej literaturze nie ma doniesień dotyczących dojrzewania oraz zapłodnienia *in vitro* oocytów oraz rozwoju zarodków uzyskanych od niedojrzałych płciowo samic kota domowego jak i dzikich kotowatych. W związku z tym, głównym celem badań było określenie przydatności oocytów pozyskanych od niedojrzałych płciowo samic kota domowego i dzikich kotowatych do procedur wspomagane go rozrodu.

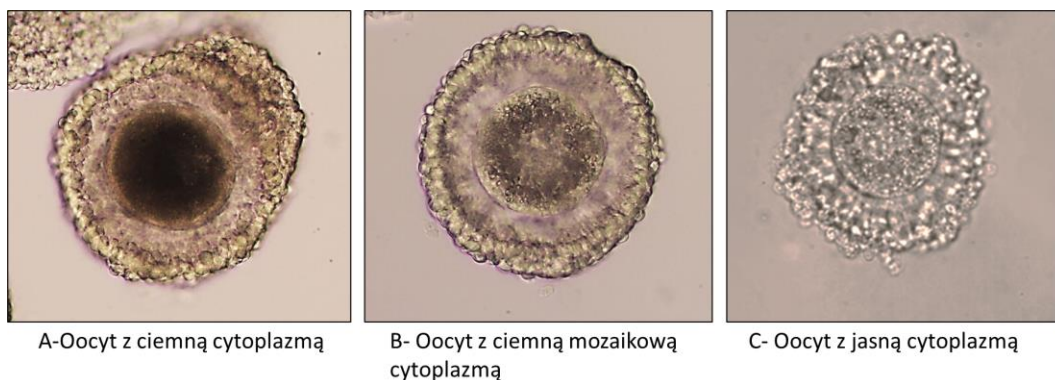
Cele szczegółowe obejmowały:

- a) Porównanie morfologii oocytów uzyskanych od dojrzałych i niedojrzałych płciowo samic kota domowego (*Felis catus*) i dzikich kotowatych; rysia (*Lynx lynx*), servala (*Leptailurus serval*), manula (*Felis manul*).
- b) Porównanie zdolności do dojrzewania *in vitro* (IVM) oocytów pozyskanych od dojrzałych i niedojrzałych płciowo samic kota domowego oraz dzikich kotowatych; manula (*Felis manul*) i rysia (*Lynx lynx*).
- c) Porównanie potencjału rozwojowego oocytów pozyskanych od dojrzałych i niedojrzałych płciowo samic kota domowego jako modelu dla dzikich kotowatych.
- d) Porównanie jakości blastocyst powstałych w wyniku zapłodnienia *in vitro* oocytów uzyskanych od dojrzałych i niedojrzałych płciowo samic kota domowego.

Realizując kolejne cele badawcze uzyskano następujące wyniki;

- a) Średnia liczba oocytów uzyskanych od niedojrzałych płciowo kotek (43 ± 29) była wyższa niż od kotek dorosłych (23 ± 11), ($p < 0.05$). Odnotowano znacząco mniej oocytów ciemnych (Ryc.5 A+B) w puli oocytów pozyskanych od niedojrzałych kotek (48-53%) w stosunku do samic dojrzałych (73-80%) ($p < 0.001$). Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w proporcji oocytów ciemnych i jasnych w zależności od gatunku. U wszystkich gatunków, bez względu na wiek, oocyty o jasnej cytoplazmie miały mniejszą średnicę ($p < 0.05$) niż oocyty ciemne.

Ryc.5. klasyfikacja oocytów ze względu na barwę cytoplazmy



- b) Wyniki dojrzewania *in vitro* były podobne u wszystkich badanych gatunków bez względu na wiek (47-52%, $p > 0.05$).
- c) Stwierdzono obniżenie zdolności do zapłodnienia oocytów pochodzących od niedojrzałych płciowo kotek domowych w stosunku do dojrzałych (42 vs. 51%; $p < 0.05$). Zaobserwowano również obniżenie potencjału rozwojowego do stadium blastocysty (28 vs. 39%; $p < 0.05$) jak i zdolności do wykluwania się w warunkach *in vitro* (8 vs. 19%; $p < 0.001$) zarodków pochodzących z oocytów kociąt w stosunku do dojrzałych kotek.
- d) Blastocysty pochodzące z oocytów pozyskanych od niedojrzałych płciowo kotek posiadały mniejszą liczbę komórek, zarówno komórek wężła zarodkowego (ICM) ($p < 0.001$) jak i komórek trofoektodermi (TE) ($p < 0.05$) w porównaniu do blastocyst pochodzących od dojrzałych samic.

Wnioski i znaczenie badań

Jajniki pozyskane od niedojrzałych płciowo kotek mogą być źródłem dobrej jakości oocytów, zdolnych do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro*. Pomimo niższego potencjału rozwojowego w stosunku do oocytów kotek w wieku reprodukcyjnym, mają zdolność rozwoju do stadium blastocysty i wyklucia się w warunkach *in vitro*. Duże podobieństwo morfologii i zdolności rozwojowych oocytów kotki domowej i badanych gatunków dzikich kotowatych potwierdza przydatność kota domowego jako modelu badawczego dla dzikich kotowatych. Uzyskane wyniki są istotne ze względu na możliwość wykorzystania oocytów od młodych samic dzikich kotowatych zagrożonych wyginięciem w programach ochrony *ex situ* opartych na technikach wspomaganego rozrodu.

P-3

Kochan J*, Nowak, A., Kij, B., Prochowska, S., Nizański, W.

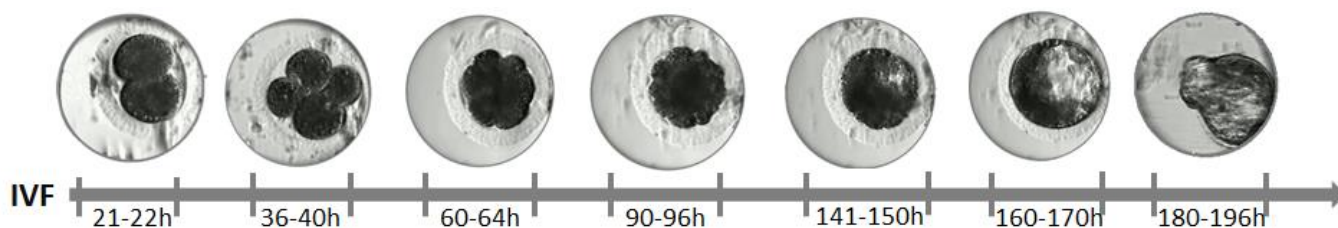
*Analysis of morphokinetic parameters of feline embryos using a time-lapse system.**Animals 2021, 11(3), 1–10,*

W przypadku niewielkiej liczby cennych zarodków, istotne jest dokładne ich monitorowanie podczas hodowli *in vitro*, tak aby wybrać do transferu zarodek o największych predyspozycjach do implantacji. Ma to szczególne znaczenie w przypadku zarodków pochodzących od cennych osobników lub gatunków zagrożonych wyginięciem jak np. dzikie kotowate. Monitoring przy użyciu systemów „time-lapse” jest nieinwazyjną metodą obserwacji rozwoju zarodków w czasie rzeczywistym, pozwalającą na precyzyjne określenie parametrów morfokinetycznych poszczególnych zarodków takich jak; czas pierwszego i kolejnych podziałów, odstępy pomiędzy podziałami, czas formowania się moruli i blastocysty, czas wykluwania się blastocysty. Jednocześnie możliwe jest wychwycenie wad morfologicznych zarodków (asymetria, fragmentacja cytoplazmy, wakuolizacja), a w szczególności wad, które występują tylko chwilowo na poszczególnych etapach, i mogą zostać przeoczone podczas tradycyjnej oceny np. podział bezpośredni czy podział odwrócony. Od ponad dekady, systemy „time-lapse” są z powodzeniem stosowane do monitorowania i selekcji do transferu zarodków ludzkich [Wong i wsp 2010, Sciorio i wsp 2017], a w ostatnich latach także w badaniach nad rozwojem zarodków mysich, bydłych czy owczych [Truong i wsp. 2017, Sugimura i wsp. 2017, Fryc i wsp. 2021]. Dotychczas, próby określenia kinetyki zarodków kotów ograniczyły się jedynie do tradycyjnej oceny mikroskopowej zarodków w 18, 24 i 30 lub w 27 i 42 godzinie po zapłodnieniu *in vitro* (Klincumhom i wsp. 2012, Ochota i wsp. 2017). W związku z deficytem tego typu badań u kotowatych celem pracy była analiza morfokinetyki zarodków kota domowego przy użyciu systemu time-lapse (Primo Vision®).

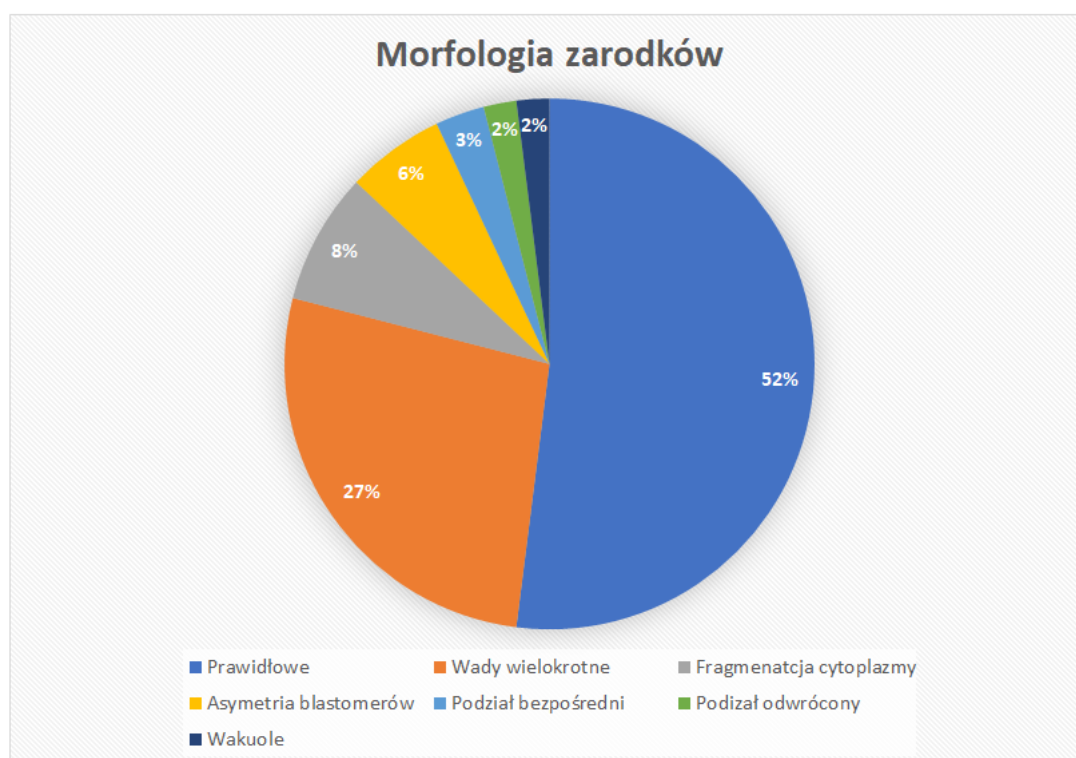
Na podstawy analizy 300 zarodków w systemie time-lapse uzyskano następujące wyniki;

- a) Najwcześniejszy podział zarodków odnotowano w 17 godzinie, a najpóźniejszy w 38 godzinie po zapłodnieniu *in vitro* (IVF).
- b) Najwięcej zarodków (46%) dzieliło się 21-24h po IVF, z czego najlepszy potencjał rozwojowy posiadały zarodki dzielące się 21-22h po IVF.
- c) Zarodki dzielące się bardzo wcześnie (17–18h po IVF) miały obniżony potencjał rozwojowy do stadium blastocysty, natomiast dzielące się później niż 27h po IVF nie były zdolne do osiągnięcia stadium blastocysty.
- d) Proces kawitacji (pojawienia się jamy blastocysty) rozpoczynał się 127–167h po IVF, przy czym największy potencjał do wykluwania się miały zarodki w których jama zaczęła pojawiać się pomiędzy 142-150h po IVF. Blastocysty powstające po 161h po IVF nie były zdolne do wyklucia się w warunkach *in vitro*.
- e) Wady morfologiczne zaobserwowano w 48% zarodkach, z czego najczęściej spotykane były wady wielokrotne (27%), a spośród wad pojedynczych najczęściej spotykaną była fragmentacja cytoplazmy (8%).

Ryc.6. Morfokinetyka zarodka kociego (średni czas osiągnięcia kolejnych stadiów rozwojowych).



Ryc.7. Procentowy udział poszczególnych wad morfologicznych w populacji zarodków kocich.



Wnioski i znaczenie badań

W wyniku badań ustalono precyzyjnie parametry morfokinetyczne oraz ich wpływ na potencjał rozwojowy zarodków kota odmowego. Czas pierwszego i drugiego podziału, czas powstawania jamy blastocysty i anomalie morfologiczne można wykorzystać jako wczesne wskaźniki prognostyczne potencjału rozwojowego zarodka kota domowego. Wiedza dotycząca morfokinetyki zarodków kota domowego może stać się niezwykle istotna w przypadku cennych zarodków dzikich kotowatych. Transfer zarodków u dzikich kotowatych jest niezwykle skomplikowaną procedurą, często wykonywaną tylko jeden raz bez możliwości powtórzenia, a wybór odpowiednich zarodków do transferu decyduje w dużej mierze o sukcesie całej procedury. Wyniki badań morfokinetyki zarodków kocich umożliwią transfer wyselekcjonowanych zarodków o najwyższym potencjale

rozwojowym w programach ochrony dzikich kotowatych wykorzystujących techniki wspomaganego rozrodu jak i w hodowli rasowych kotów domowych.

P-4

Kochan J., Nowak A., Niżański W., Prochowska S., Migdał A., Młodawska W., Partyka A., Witkowski M *Developmental competence of cat (*Felis domesticus*) oocytes and embryos after parthenogenetic stimulation using different methods.*
Zygote. 2018, 22, 1-8.

Aktywacja oocyty zapoczątkowana zostaje przez wnikięcie plemnika podczas procesu zapłodnienia i polega na uwolnieniu wewnątrzkomórkowych rezerw wapnia, egzocytozie ziaren korowych, wznowieniu mejozy, wyrzuceniu drugiego ciała kierunku, a następnie utworzeniu przedjądrzy i podziale zygoty. Oocyty ssaków mogą ulegać aktywacji bez udziału plemnika na skutek działania czynników fizycznych, mechanicznych lub chemicznych, na skutek zmian hormonalnych w jajniku czy podczas dojrzewania *in vitro*. Można również wzbudzić niekontrolowaną aktywację oocyty poprzez mechaniczne nakłucie podczas procedury ICSI. Tak więc, na różnych etapach procedur pozaustrojowej produkcji zarodków możliwe jest wzbudzenie podziału oocyty bez plemnika i rozwój partenogenetyczny zarodków, co może się przełożyć na zafałszowanie wyników procedur. U ssaków istnieje również możliwość wzbudzenia kontrolowanej aktywacji chemicznej przy użyciu różnych czynników aktywujących takich jak np. etanol, jonomycyna, jonofor wapnia, cytochlazyna B, cyklohexamid, thimerosal, 6-DMAP. U kotów, gdzie wydajność procedur ART jest stosunkowo niska w porównaniu do innych gatunków istotne jest badanie czynników determinujących prawidłowy przebieg zapłodnienia i rozwój zarodków. Ponadto konieczne jest określenie ryzyka niekontrolowanego wzbudzenia podziału partenogenetycznego podczas procedury ICSI. W związku z tym, celem badań było określenie zdolności do aktywacji oocytów kota domowego podczas różnych etapów procedur pozaustrojowej produkcji zarodków i pod wpływem różnych czynników aktywujących.

W ramach badań przeanalizowano możliwość wzbudzenia podziałów oocytów poprzez;

- a) aktywację w obrębie jajnika poprzez (aktywacja naturalna),
- b) aktywację spontaniczną podczas dojrzewania *in vitro* oocytów,
- c) aktywację przy udziale plemnika podczas procedury ICSI,
- d) aktywację mechaniczną podczas nakłucia oocyty pustą pipetą iniekcyjną,
- e) aktywację chemiczną kombinacją 2 czynników aktywujących (jonomycyna+6-DMAP).

Analizując kolejne czynniki aktywujące uzyskano następujące wyniki:

- a) Bezpośrednio po pozyskaniu oocytów z jajników stwierdzono 6% oocytów, które uległy aktywacji.

- b) Podczas procedury dojrzewania *in vitro* (IVM) 7% oocytów uległo spontanicznej aktywacji.
- c) Stosując sztuczną aktywację chemiczną uzyskano 53% dzielących się zarodków.
- d) W wyniku mikroiniekcji plemnik zapłodnieniu uległo 54% oocytów. Tylko w tej grupie oocytów uzyskano zarodki w stadium blastocysty.
- e) W wyniku aktywacji mechanicznej, poprzez nakłucie pustą pipetą iniekcyjną uzyskano 8% zarodków.

Wnioski i znaczenie badań

Na każdym etapie produkcji zarodków kota domowego *in vitro* dochodzi do kontrolowanej lub niekontrolowanej aktywacji oocytów. Wyniki badań pokazują, że oocyty kotów mogą ulegać spontanicznej aktywacji w jajniku lub podczas dojrzewania *in vitro*. Jednakże powstałe w ten sposób zarodki partenogenetyczne rozwijają się jedynie do stadium 2-4 blastomerów. Kontrolowana, sztuczna aktywacja czynnikami chemicznymi jest szybką, tanią i łatwą metodą produkcji dużej liczby zarodków bez użycia plemników. Uzyskane w ten sposób zarodki kota domowego rozwijają się do stadium moruli. Umożliwia to prowadzenie wielu badań na zarodkach np. np. izolacje komórek macierzystych czy optymalizację warunków hodowli *in vitro*. Jest to szczególnie istotne u gatunków z niską efektywnością procedur zapłodnienia *in vitro* lub przy ograniczonym dostępie do nasienia danego gatunku. Podczas ICSI natomiast może dojść do niekontrolowanego wzbudzenia podziału partenogenetycznego na skutek mechanicznego nakłucia a co za tym idzie wyniki ICSI mogą być zawyżane gdyż wśród zarodków zapłodnionych po wstrzyknięciu plemnika mogą pojawić się zarodki partenogenetyczne.

Podsumowanie szczególnego osiągnięcia naukowego

Przedstawione w kolejnych publikacjach badania dotyczyły hodowli *in vitro* zarodków kota domowego jako modelu badawczego dla dzikich kotowatych. W ramach badań będących przedmiotem głównego osiągnięcia naukowego skupiono się na analizie szeregu czynników determinujących efektywność hodowli *in vitro* zarodków kota domowego. W trakcie badań przeanalizowano siedem wariantów hodowli *in vitro* zarodków ze względu na objętość kropli hodowlanej i zagęszczenie zarodków, oraz hodowli w mikrodołkach. Przeanalizowano również kilka wariantów współhodowli zarodków kocich w układzie homospecyficznym (zarodki kocie + zarodki kocie w zaawansowanym stadium rozaju) i heterospecyficznym (zarodki kocie + zarodki owcze w zaawansowanym stadium rozwoju). Zbadano również wpływ obecności niezapłodnionych oocytów na wyniki hodowli zarodków. Wyniki umożliwią precyzyjny dobór metody hodowli w zależności od sytuacji, szczególnie w przypadku hodowli bardzo cennych zarodków dzikich kotowatych zagrożonych wyginięciem, kiedy każdy przypadek należy rozpatrywać indywidualnie. W kolejnych badaniach skupiono się na analizie wpływu wieku dawczyni oocytów na ich jakość, zdolność do dojrzewania *in vitro* i

zapłodnienia oraz jakości blastocyst. Określono również stopień podobieństwa oocytów kota domowego do innych gatunków kotowatych (manula, rysia, sewala), zarówno dojrzałych i niedojrzałych płciowo. Wyniki potwierdziły istotne podobieństwo oocytów kota domowego i dzikich kotowatych oraz możliwość wykorzystania oocytów uzyskanych od niedojrzałych płciowo samic do procedur IVM i IVF, co jest niezwykle istotne ze względu na wysoką śmiertelność młodych dzikich kotowatych.

W badaniach określono również wpływ parametrów morfokinetycznych na potencjał rozwojowy zarodków kocich oraz oszacowano udział poszczególnych wad morfologicznych w populacji zarodków kocich *in vitro*. Uzyskane wyniki umożliwią w przyszłości opracowanie algorytmu selekcji do transferu zarodków o najwyższym potencjale rozwojowym. W trakcie badań przeanalizowano również możliwości kontrolowanej i niekontrolowanej aktywacji oocytów na różnych etapach procedur *in vitro*. Określono możliwość zafałszowania wyników poprzez pojawienie się zarodków partenogenetycznych w puli zarodków diparentalnych.

Uzyskane wyniki w ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego mogą przyczynić się do poprawy efektywności hodowli zarodków kota domowego jak i mieć zastosowanie podczas procedur pozaustrojowego uzyskiwania zarodków dzikich kotowatych.

Szczególny wkład w rozwój dyscypliny weterynaria

Szczególny wkład w rozwój dyscypliny weterynaria stanowi pogłębienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej hodowli i rozwoju zarodków kocich w warunkach *in vitro* poprzez ;

- opisanie po raz pierwszy parametrów i wzorców morfokinetycznych w rozwoju zarodków kocich,
- wskazanie najbardziej efektywnych systemów hodowli *in vitro* zarodków kocich
- udowodnienie możliwości wykorzystania oocytów pozyskanych od niedojrzałych płciowo, padłych samic kota domowego i dzikich kotowatych w procedurach wspomaganego rozrodu (ART),
- oszacowanie niebezpieczeństwa wzbudzenia niekontrolowanych podziałów partenogenetycznych na każdym etapie procedury zapłodnienia *in vitro*,
- udowodnienie podobieństwa morfologicznego i zdolności rozwojowych w hodowli *in vitro* oocytów kota domowego i dzikich kotowatych

Wyniki badań dają możliwość udoskonalenia i bezpiecznego stosowania technik wspomaganego rozrodu w programach ochrony dzikich kotowatych zagrożonych wyginięciem.

Piśmiennictwo

1. Alam M.E., Iwata J., Fujiki K., Tsujimoto Y., Kanegi R., Kawate N., Tamada H., Inaba T., Sugiura K., Hatoya S. Feline embryo development in commercially available human media supplemented with fetal bovine serum. *J Vet Med Sci.* 2019, 27, 629-635.
2. Armstrong, D.T.; Holm, P.; Irvin, B.; Petersen, B.A.; Stubbings, R.B.; McLean, D.; Stevens, G.; Seamark, R.F. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 1992, 38, 667–678.
3. Donoghue A.M., Johnston L.A., Seal U.S., Armstrong D.L., Tilson R.L., Wolf P., Petrini K., Simmons L.G., Gross T., Wildt D.E. In vitro fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod* 1990, 43,733-744.
4. Fryc K., Nowak A., Kij B., Kochan J., Bartlewski P.M. Murawski M.: Timing of cleavage divisions determined with time-lapse imaging is linked to blastocyst formation rates and quality of in vitro-produced ovine embryos. *Theriogenology* 2021, 159, 147–152.
5. Gomez M.C, Pope C.E., Harris S.R., Mikota S., Dresser B.L.: Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* 2003, 60, 239-251.
6. Gómez M.C., Pope C.E., Giraldo A., Lyons A., Harris R.F., King A.L., Cole A., Godke R.A., Dresser B.L.: Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 2004, 6, 247–258.
7. Gómez M.C., Pope C.E., Kutner R.H., Ricks D.M., Lyons L.A., Ruhe M., Dumas C., Lyons J., López M., Dresser B.L., Reiser J.: Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning and Stem Cells* 2008,10,469-484.
8. Goodrowe K.L., Wall R.J., O'Brien S.J., Schmidt P.M., Wildt D.E.: Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 1998, 39, 355–372.
9. Kij B., Kochan J., Nowak A., Nizański W., Prochowska S., Fryc K., Monika Bugno-Poniewierska M.: Using time lapse monitoring for determination of morphological defect frequency in feline embryos after in vitro fertilization (IVF). *Animals* 2019; 10:3.
10. Klincumhom N., Thongphakdee A., Techakumphu M., Chatdarong K.: Time of the first embryonic cleavage indicates cat blastocyst quality. *Thai J. Vet. Med.* 2012, 42, 67–72.
11. Kochan J., Nowak A., Nizański W., Prochowska S., Migdał A., Młodawska W., Partyka A., Witkowski M.: Developmental competence of cat (*Felis domesticus*) oocytes and embryos after parthenogenetic stimulation using different methods. *Zygote* 2018, 22,1-8.
12. Leoni G.G., Palmerini M.G., Satta V., Succu S., Pasciu V., Zinellu A., Carru C., Macchiarelli G., Nottola S.A., Naitana S.: Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. *PLoS ONE* 2015, 20, e0124911.
13. Meirelles V., Ceatano A., watanabe Y., Ripamonte P., Carambula S., Merighe G., Garcia S. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Repros. Sci.* 2004, 82, 13-20.
14. Morton K.M.: Developmental capabilities of embryos produced in vitro from prepubertal lamb oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 2008, 43, 137–143.
15. Nanogaki T., Noda Y., Goto Y., Kishi J., Mori T.: Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1994, 11, 482-488.
16. Ochota M., Nizański W.: Time of early cleavage affects the developmental potential of feline preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*, 2017, 89, 26–31.
17. Pope C.E., Keller G.L., Dresser B.L.: In vitro fertilization in domestic and nondomestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *J Reprod Fertil suppl.* 1993, 47, 189-201.

18. Pope C.E, McRae M.A, Plair B.L., Keller G.L., Dresser B.L.: In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J Reprod Fertil suppl.* 1997, 51, 69–82.
19. Pope C.E., Gomez M.C., Dresser B.L.: In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology* 2006, 66, 518-524.
20. Pope C.E., Gomez M.C., Cole A., Dumas C., Dresser B.L.: Oocyte recovery, in vitro fertilization and embryo transfer in the serval (*Leptailurus serval*). *Reprod Fertil Dev* 2006, 18, 223 (abstract).
21. Pope C.E., Gomez M., Dresser B.L.: In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology* 2006, 66, 59-71.
22. Pope C.E., Gomez M.C., Galiguis J., Dresser B.L.: Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats. *Reprod Domest Anim* 2012, 47, 125-129.
23. Prochowska S., Niżanski W., Partyka A., Kochan J., Młodawska W., Nowak A., Skotnicki J., Grega T., Pałys M. The use of human and bovine commercial media for oocyte maturation and embryo development in the domestic cat (*Felis catus*). *Reprod Domest Anim.* 2019, 54, 719-726.
24. Prochowska S., Niżański W., Partyka A., Kochan J., Młodawska W., Nowak A., Skotnicki J., Grega T., Pałys M.: Influence of the type of semen and morphology of individual sperm cells on the results of ICSI in domestic cats. *Theriogenology* 2019, 131, 140-145.
25. Ptak G., Loi P., Dattena M., Tischner M., Cappai P.: Offspring from one-month-old lambs: Studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod.* 1999, 61, 1568–1574.
26. Roth T.L., Swanson W.F., Wildt D.E.: Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. *Biol. Reprod.* 1994, 51, 441–451.
27. Sciorio R., Thong J.K., Pickering S.J.: Comparison of the development of human embryos cultured in either an EmbryoScope or benchtop incubator. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2017, 15, 1100–1106.
28. Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., Buck S., Murphy K., Lyons L., Westhusin M.A.: Cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002, 415-859.
29. Spindler R.E., Wildt D.E.: Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture. *Biol Reprod* 2002, 66, 167-173.
30. Spindler R.E., Crichton E.G., Yuksel A., Loskutoff N., Critser J., Gardner D.K., Wildt D.E.: Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. *Theriogenology* 2006, 66, 82-92
31. Sugimura S., Akai T., Imai K.: Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *J. Reprod. Dev.* 2017, 63, 353–357.
32. Truong T., Gardner D.K.: Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Hum. Reprod.* 2017, 32, 2404–2413.
33. Wild and Wood. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. *Reproduction* 1997, 110, 355-360.
34. Wong C.C., Loewke K.E., Bossert N.L., Behr B., De Jonge C.J., Baer T.M., Reijo Pera R.A.: Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 2010, 28, 1115–1121.

5. Omówienie osiągnięć naukowych innych niż przedstawione do postępowania habilitacyjnego oraz informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury w szczególności zagranicznej.

Przez cały okres swojej kariery naukowej zajmuję się szeroko pojętą embriologią eksperymentalną zwierząt gospodarskich i towarzyszących, w szczególności koni i kotów.

Techniki wspomaganego rozrodu u koni

Uzyskiwanie zarodków końskich w warunkach in vitro

W 2005 roku rozpoczęłam studia doktoranckie na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, w ówczesnej Katedrze Rozrodu Zwierząt, gdzie prowadziłam badania związane z zapłodnieniem wspomaganym oraz aktywacją partenogenetyczną oocytów klaczy [P-36, PB-5, D-1, D-56, D-57]. W 2007 roku uzyskałam grant promotorski na realizację tych badań, a w 2009 roku obroniłam z wyróżnieniem pracę doktorską pt.: *Badanie in vitro zdolności rozwojowych oocytów klaczy po mikroiniekcji plemnika i aktywacji partenogenetycznej*. W wyniku tych badań udało się uzyskać po raz pierwszy w Polsce zarodki końskie po zapłodnieniu *in vitro* (ICSI), kiedy w ówczesnym czasie tylko kilka ośrodków na świecie uzyskiwało zarodki końskie w warunkach pozaustrojowych. W związku z trudnościami z produkcją dużej liczby zarodków końskich *in vitro* w ramach naszych badań opracowano optymalną metodę (kombinacja jonomycyny i 6-DMAP) sztucznej aktywacji oocytów klaczy i uzyskiwania zarodków partenogenetycznych jako alternatywy dla zarodków diparentalnych po zapłodnieniu *in vitro*. W latach 2006-2009 byłam również wykonawcą w projekcie KBN pt. *„Środowisko hormonalne pęcherzyków jajnikowych źrebiąt, a zdolność oocytów do dojrzewania i zapłodnienia”* [P-27]. Najważniejszym osiągnięciem podczas realizacji tego projektu było wykazanie, iż oocyty pozyskane od niedojrzałych płciowo źrebiąt mają zdolność do dojrzewania w warunkach *in vitro* i mogą zostać wykorzystane w procedurach pozaustrojowej produkcji zarodków.

Optymalizacja technik kriokonserwacji oocytów i zarodków koni

Kontynuując badania w zakresie embriologii koni skupiłam się na tematyce związanej z kriokonserwacją oocytów i zarodków koni. Byłam promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej dr n. wet. Agnieszki Nowak, pt. *„Badanie kompetencji rozwojowej witrifikowanych oocytów klaczy po aktywacji partenogenetycznej i zapłodnieniu wspomaganym (ICSI)”*, we współpracy z **Instytutem Zootechniki w Balicach** [P-16] oraz **Instytutem Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu** [P-35], gdzie przeszliśmy szkolenie w zakresie stosowania technik mikroobjętościowych do witrifikacji oocytów, a następnie testowaliśmy metodę Rapid I na oocytach końskich. Kolejne etapy badań kontynuowaliśmy w UR Kraków. W 2017 r Doktorantka obroniła z wyróżnieniem pracę doktorską na **Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu**

Przyrodniczego we Wrocławiu. W ramach długoletnich badań przetestowano szereg metod oraz kombinacji krioprotektorów do kriokonserwacji oocytów klaczy i udowodniono, że najbardziej skuteczną jest metoda witryfikacji w systemie Rapid-I® stosowanym w medycynie człowieka do kriokonserwacji oocytów i zarodków ludzkich i przy użyciu komercyjnego medium do kriokonserwacji zarodków końskich EquiPro VitKit® [D-2, D-52, D-58]. W wyniku tych badań udało się uzyskać zarodki po zapłodnieniu *in vitro* (ICSI) witryfikowanych oocytów klaczy, co do tej pory jest rzadkością na świecie i tylko nieliczne ośrodki skutecznie wykonują taką procedurę.

Jednocześnie brałam udział w badaniach dotyczących analizy fragmentacji DNA w zarodkach końskich poddanych konserwacji różnymi metodami [P-9, D-53, D-59]. W trakcie badań analizowano poziom fragmentacji DNA w zarodkach końskich wyplukiwanych *in vivo* i poddawanych krótko- lub długotrwałej konserwacji analizując jednocześnie wpływ metody konserwacji oraz wieku zarodka. Wykazano że najniższy indeks DCI (*dead cell index*) występuje w zarodkach witryfikowanych w systemie Rapid I. Badania zakończono próbą biologiczną, w wyniku której urodziło się źrebię po transferze ośmioldniowego zarodka witryfikowanego wyżej wspomnianą metodą, potwierdzając jej skuteczność i możliwość skutecznej kriokonserwacji zarodków końskich w zaawansowanym stadium rozwojowym.

Ocena wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na dojrzewanie *in vitro* oocytów klaczy

Obecnie jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr inż. Julii Gabryś pt. „Ocena wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na jakość oocytów klaczy, dojrzewających w warunkach *in vitro*” we współpracy z **Zakładem Biologii Komórki, Uniwersytetu Jagiellońskiego** [P-8, D-4, D-7, D-11]. Na realizację tych badań Doktorantka otrzymała grant promotorski NCN. Badania dotyczą możliwości wykorzystania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV- *extracellular vesicles*) pozyskanych z płynu pęcherzykowego jajnika do wspomagania procesu dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*. Dotychczas wykazano, że dodatek EV poprawia efektywność dojrzewania jądrowego oocytów oraz stopień rozproszenia wzgórka jajonośnego. Kolejnym etapem badań będzie analiza bioinformatyczna, której celem będzie ocena wpływu EV na transkryptom w komórkach ziarnistych oocytów. Są to badania pionierskie, a publikacja P-8 jest pierwszą na świecie dotyczącą zastosowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych u koni.

Zastosowanie techniki mikroprzepływów do selekcji plemników ogiera

Od roku 2021 jestem członkiem Zespołu realizującego projekt pt. „Opracowanie i zastosowanie innowacyjnego prototypu mobilnego laboratorium andrologicznego w celu utworzenia banku nasienia ogierów rasy huculskiej i małopolskiej” w ramach Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich (Europejski Fundusz Rolny). W ramach realizowanego projektu biorę udział w badaniach dotyczących wykorzystania metody mikroprzepływów

do selekcji plemników ogiera [D-3, D-6]. Wstępnie wykazano, że technika mikroprzepływów zastosowana na nasieniu ogierów, jest skuteczną metodą selekcji plemników o ruchu postępowym oraz plemników o niskiej fragmentacji DNA. W kolejnym etapie badań podejmiemy próbę zastosowania komory do mikroprzepływu do selekcji plemników ogiera poddanych kriokonserwacji. Badania mają charakter aplikacyjny, a potwierdzona skuteczność metody i jej zastosowanie w praktyce umożliwi tworzenie wartościowych dawek inseminacyjnych od ogierów z obniżonymi parametrami nasienia lub od ogierów, u których proces kriokonserwacji znacząco obniża żywotność plemników.

W trakcie badań dotyczących biotechnologii koni współpracowałam z **Clinica Ostetrica e Ginecologia Veterinaria, Universita di Pisa (Prof. Francesco Camillo, Prof. Duccio Panzani)**, [P-29, D-2], dzięki czemu Uniwersytet Rolniczy w Krakowie podpisał porozumienie o współpracy z Uniwersytetem w Pizie i wielu moich magistrantów i doktorantka odbyli praktyki Erasmus na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Pizie.

Techniki wspomaganego rozrodu u kota domowego i dzikich kotowatych

W kolejnym etapie mojej pracy naukowej prowadziłam badania z zakresu embriologii eksperymentalnej na modelu kota domowego w kontekście ochrony zagrożonych gatunków dzikich kotowatych. W 2014 roku odbyłam miesięczny staż naukowy w **Katedrze Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu**. Podczas stażu zdobyłam doświadczenie w zakresie technik wspomaganego rozrodu u kotów, jak również opracowaliśmy wspólnie z Zespołem UP Wrocław koncepcję wspólnego projektu badawczego. W 2015 roku zostałam koordynatorem z ramienia Uniwersytetu Rolniczego w konsorcjum naukowo-przemysłowym (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu- Uniwersytet Rolniczy w Krakowie- Ogród Zoologiczny w Krakowie), które realizowało projekt NCBiR pt. „*Zwiększenie innowacyjności i efektywności programów ochrony zasobów genetycznych dzikich kotowatych poprzez utworzenie banku komórek i wdrożenie do praktyki metod pozaustrojowej produkcji zarodków*”.

Utworzenie banku komórek kota domowego i dzikich kotowatych i badania nad hodowlą in vitro fibroblastów kotów

W ramach realizacji projektu współuczestniczyłam w tworzenie banku komórek (fibroblastów, plemników i oocytów) kota domowego i dzikich kotowatych, współpracując z **Katedrą Rozrodu, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu** oraz z Ogrodami Zoologicznymi w Krakowie, Opolu, Borysewie, Chorzowie, Wrocławiu, Gdańsku [P-7, P-13, P-18, P-21, P-22, P-23, P-24, P-25, PB-3, D-12, D-13, D-19, D-22, D-24, D-27, D-35, D-37, D-41, D-46]. W utworzonym banku komórek zgromadzono komórki od 18 gatunków dzikich kotowatych, oraz od 10 ras kotów domowych) co stanowi unikatowy zbiór o ogromnym znaczeniu w ochronie bioróżnorodności tych zwierząt. W trakcie tworzenia banku przeprowadzono szereg

badania dotyczących optymalizacji protokołu hodowli *in vitro* fibroblastów kotów. Analizowano wpływ różnych pożywek hodowlanych i różnych dawek bFGF (*basic fibroblast growth factor*) na proliferację i żywotność fibroblastów skórnych pod kątem bankowania komórek [P-23, D-27, D-35]. Wykazano, że optymalną pożywką do hodowli fibroblastów kocich jest pożywka DMEM F12, a jej suplementacja 5ng bFGF/ml przyspiesza proliferację komórek. Wyniki badań, które mogą przyczynić się nie tylko do tworzenia nowych ale także do odbudowy i utrzymania zdeponowanej rezerwy genetycznej dzikich kotowatych. Kolejne badania [P-7, D-22] dotyczyły synchronizacji cyklu komórkowego (G0/G1) komórek kota domowego i dzikich kotowatych (manul, jaguarundi) poprzez głodzenie lub inhibicję kontaktową. Wykazano że głodzenie komórek poprzez obniżenie zawartości surowicy FBS w pożywce z 10% do 0,5% było skuteczniejszą metodą niż hodowla w pełnej konfluencji. Dodatkowo stwierdzono, że skuteczność metod jest specyficzna gatunkowo. Wyniki badań są istotne w kontekście wykorzystania fibroblastów w fazie G0/G1 cyklu komórkowego do procedury klonowania somatycznego.

Podczas realizacji projektu zostałam zaproszona do współpracy przez **Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Stanowego Parana w Brazylii** (prof. Nei Moreira) oraz **Parku Dzikich Zwierząt ITAIPU w Paragwaju** (prof. Zalmir Silvino Cubas), gdzie brałam udział (02.03.-02.04. 2017r) w badaniach dotyczących kriokonserwacji nasienia dzikich kotowatych i tworzeniu banku nasienia dzikich kotowatych z rezerwatu ITAIPU [P-21].

Optymalizacja warunków hodowli *in vitro* zarodków kocich

W drugiej części projektu prowadziłam badania dotyczące optymalizacji warunków hodowli *in vitro* zarodków kotów z wykorzystaniem systemu monitorowania rozwoju zarodków *time-lapse*. Na podstawie tych badań przygotowałam cykl publikacji [P1, P-2, P-3, P-4] stanowiący podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Ponadto jestem współautorką publikacji dotyczącej wpływu metody pozyskania plemników oraz ich morfologii na wydajności procedury ICSI u kotów [P-22]. Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono różnic w rozwoju zarodków uzyskanych po zapłodnieniu plemnikami pozyskanymi z cewki moczowopłciowej, a plemnikami pozyskanymi z najądrzy. Wykazano również, że wykorzystanie nasienia z teratozoospermią nie obniża wyników ICSI.

Optymalizacja techniki witrifikacji oocytów kota domowego i dzikich kotowatych

Pośród moich zainteresowań naukowych związanych z technikami wspomaganego rozrodu znalazły się również zagadnienia dotyczące optymalizacji techniki kriokonserwacji oocytów kota domowego i dzikich kotowatych [P-6, P-18, P-25, D-33]. Na bazie doświadczenia z kriokonserwacją oocytów koni, zdecydowano się na przetestowanie u kotów komercyjnych zestawów do witrifikacji oocytów ludzkich.

Przeanalizowano trzy zestawy mediów i nośników do witrifikacji w małych objętościach (Cryotech®, Kitazato®, Vitrolife®). Po analizie toksyczności mediów witrifikacyjnych, przeżywalności oocytów po rozmrożeniu i ich kompetencji rozwojowych po zapłodnieniu *in vitro* wykazano, że najbardziej skutecznym zestawem do witrifikacji kocich oocytów jest zestaw Vitrolife®. Stosowanie komercyjnych protokołów skutecznej witrifikacji oocytów kocich daje możliwość szybkiego reagowania w nagłych wypadkach i zabezpieczania cennych komórek od gatunków zagrożonych wyginięciem. W ten sposób udało się nam zabezpieczyć oocyty serwala i rysia po śmierci samic w nagłych wypadkach [P-25].

Identyfikacja zaburzeń chromosomowych w gametach i zarodkach kota domowego

W latach 2019-2022 pełniłam funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr inż. Barbary Kij pt. „Analiza potencjału rozwojowego i zaburzeń chromosomowych zarodków kota domowego (*Felis catus*) uzyskiwanych po zapłodnieniu *in vitro*”. Badania były realizowane we współpracy z **Veterinary Research Institute w Czechach**, finansowane z grantu promotorskiego, a praca doktorska obroniona z wyróżnieniem w lipcu 2022r na podstawie cyklu trzech, spójnych tematycznie publikacji [P-11, P-19, P-20].

W trakcie badań przeanalizowano zależność pomiędzy czasem tworzenia się jamy blastocysty, częstotliwością i czasem trwania *collapse*- zapadania się jamy blastocysty, a jakością blastocyst i ich zdolnością do wykluwania w warunkach *in vitro* [P-19]. Wyniki badań wskazują, że czas powstawania jamy blastocysty nie jest związany z jakością blastocysty. Natomiast liczba zapadnięć jamy blastocysty i zdolność do wykluwania były dodatnio skorelowane z jakością blastocysty. W publikacji P-11 po raz pierwszy opisano związek pomiędzy morfologią, a ploidalnością zarodków kotów domowych, wykorzystując obserwację zarodków w systemie time-lapse i fluorescencyjną hubrydyzację *in situ* (FISH) do oceny zarodków. Prawidłową liczbę chromosomów stwierdzono u 41% zarodków, 29% zarodków było haploidalnych, a u 29% odnotowano mazaicyzm. Ponadto stwierdzono zależność pomiędzy jakością blastocyst, a częstotliwością występowania zaburzeń w liczbie chromosomów. Blastocysty, u których na wcześniejszych etapach rozwoju wystąpiły wady morfologiczne znacznie częściej posiadały wadliwą liczbę chromosomów. Wyniki mogą się przysłużyć do opracowania kryteriów selekcji najbardziej rokujących zarodków do transferu. Technikę FISH wykorzystano również po raz pierwszy do wizualizacji chromosomów płci w plemnikach kotów [P-14].

Techniki wspomaganego rozrodu u innych gatunków zwierząt

W ramach działalności naukowej prowadziłam również badania dotyczące technik wspomaganego rozrodu u innych gatunków zwierząt; owiec, bydła, królików.

W 2006 roku odbyłam miesięczny staż na **Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Teramo we Włoszech** (prof. Pasqualino Loi, prof. Grażyna Ptak), gdzie

zajmowałam się aktywacją partenogenetyczną zarodków owczych. Jestem również współautorem czterech publikacji dotyczących monitorowania rozwoju zarodków owczych w warunkach *in vitro* oraz ich kriokonserwacji [P-5, P-10, P-12, P-17]. W badaniach określono możliwość wykorzystania parametrów morfokinetycznych zarodków owczych jako markerów ich zdolności rozwojowych do stadium blastocysty i jakości blastocyst [P-17]. Zarodki najlepszej jakości zaczynały się dzielić średnio w 23 godzinie po zapłodnieniu i posiadały potencjał do rozwoju blastocysty oraz wykluwania. Natomiast zarodki, których pierwszy podział był opóźniony średnio o 7 godzin były złej jakości i nie rozwijały się do stadium blastocysty. Również opóźnione kolejne podziały skutkowały złą jakością blastocyst lub ich brakiem. Tak więc, parametry kinetyczne zarodków mogą być markerami prawidłowego rozwoju zarodków owczych. W kolejnych badaniach [P-12] próbowano przeanalizować inne parametry, takie jak morfometria przypuszczalnych zygot (średnica, grubość osłonki przejrzystej, obszar przestrzeni okołozółtkowej) i fototekstura cytoplazmy jako markery zdolności rozwojowych zarodków owczych. Spośród analizowanych parametrów jedynie obszar przestrzeni okołozółtkowej był skorelowany z potencjałem rozwojowym zarodków. Przypuszczalne zygoty z rozszerzoną przestrzenią okołozółtkową miały ograniczone zdolności rozwojowe (4040 ± 1850 vs. $857 \pm 262 \mu\text{m}^2$). W kolejnych badaniach [P-10] podjęto próbę określenia wpływu procesu witryfikacji na parametry morfokinetyczne i liczbę komórek w blastocystach owczych. Zarodki owcze po zapłodnieniu *in vitro*, hodowane w systemie *time-lapse* witryfikowano w stadium wczesnej blastocysty, a następnie kontynuowano ich hodowlę po rozmrożeniu w systemie *time-lapse* i wybarwiono w celu określenia liczby komórek. Wyniki porównano z blastocytami hodowanymi w systemie *time-lapse* i nie poddanymi witryfikacji. Proces witryfikacji zarodków nie wpłynął na tempo ekspansji blastocyst, natomiast znacząco wpłynął na redukcję liczby komórek w blastocystach.

W 2017 r brałam udział w badaniach dotyczących doskonalenia metod transplantacji zarodków i praktycznego ich zastosowania w produkcji owczarskiej na Ukrainie. Badania prowadzono w nowoczesnym gospodarstwie owczarskim zajmującym się hodowlą owiec ras mięsnych Texel i Oxford we współpracy z **Instytutem Biologii Zwierząt Narodowej Akademii Nauk Rolniczych Ukrainy we Lwowie** (prof. Mykola Sharan).

Ponadto brałam również udział w badaniach dotyczących kriokonserwacji oocytów i zarodków bydła oraz królików [P-26, PB-1, PB-2].

Od stycznia 2023 roku jestem również wykonawcą w projekcie pt. „Poszukiwanie genetycznych biomarkerów niepłodności idiopatycznej u mężczyzn” realizowanym we współpracy z **Katedrą Genetyki Wydziału Lekarskiego i Nauk o Zdrowiu, Krakowskiej Akademii i im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego** (Prof. Anna Sadakierska-Chudy) oraz **Małopolskiego Instytutu Leczenia i Diagnostyki Niepłodności KrakOWI** (dr n.med Jakub Wyroba).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.

a) Osiągnięcia dydaktyczne

- Ukończyłam kwalifikacyjny kurs pedagogiczny KPU.III.IL.140/33/2006
- Jestem koordynatorem 6 przedmiotów prowadzonych na kierunkach: zootechnika, bioinżynieria zwierząt, biologia stosowana i weterynaria:

L.p.	Nazwa przedmiotu	Kod przedmiotu/ kierunek studiów	Liczba godzin W/Ćw	Semestr i rok
1	Biotechniki rozrodu zwierząt	H.6s.BIO.SI.HZOBZ bioinżynieria zwierząt	15h/15h	17/18L, 18/19L, 19/20L, 20/21L, 21/22L, 22/23L
		H.1s.BRZ.SM.HZOUZ zootechnika	15h/30h	13/14L, 14/15L, 15/16L, 16/17L, 17/18L, 18/19L, 19/20L, 20/21L, 21/22L, 22/23L
		H.2s.ROZ.SM.HBIOZ biologia stosowana	15h/15h	22/23L
2	Biotechniques in animal reproduction	H.1s.RAZa.B.SM.HZOXZ Erasmus	30h/15h	21/22L, 22/23L
3	Embriologia	W.1s.EMB.SJ.WETXZ.H weterynaria	15hW	21/22Z, 20/21Z, 21/22Z, 22/23Z
4	Biomedyczne kierunki embriologii	H.RAZ.BKE9.SM.HZOBZ bioinżynieria zwierząt	15h/15h	18/19Z, 19/20Z, 20/21Z, 21/22Z
		H.RAZ.BKE9.SM.HZOUZ zootechnika	15h/15h	13/14L, 14/15Z, 15/16Z, 16/17Z, 17/18Z, 18/19Z, 19/20Z, 20/21Z, 21/22Z, 22/23Z
5	Metody oceny gamet i zarodków	H.RAZ.MOGZ9.SM.HZOUZ zootechnika	15hW	13/14Z,L, 14/15Z,L, 15/16Z,L, 16/17Z,L, 17/18Z,L, 18/19Z, 19/20Z, 20/21Z, 21/22Z
6	Rożród zwierząt	H.5s.ROZZW.SI.HZOHY zootechnika	15h/30h	19/20L, 21/22L, 22/23L

Dane z systemu USOS Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

- Koordynuję i prowadzę przedmiot w języku angielskim „*Biotechniques in animal reproduction*” dla studentów programu ERASMUS (H.1s.RAZa.B.SM.HZOXZ).
- Prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów V roku medycyny w Małopolskim Instytucie Diagnostyki i Leczenia Niepłodności „KraKovi” z przedmiotu „seksuologia i zaburzenia płodności”.

- Byłam opiekunem łącznie 78 prac dyplomowych; 32 prac inżynierskich oraz 46 prac magisterskich.
- Byłam promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich:
 - Agnieszka Nowak: *Badanie kompetencji rozwojowej wiotryfikowanych oocytów klaczy po aktywacji partenogenetycznej i zapłodnieniu wspomaganym (ICSI)*, Obrona z wyróżnieniem w dyscyplinie weterynaria, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UP Wrocław, 15.06.2017
 - Barbara Kij-Mitka: *Analiza potencjału rozwojowego i zaburzeń chromosomowych zarodków kota domowego (Felis catus) uzyskiwanych po zapłodnieniu in vitro*. Obrona z wyróżnieniem w dyscyplinie zootechnika i rybactwo, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, UR Kraków, 14.07.2022.

Obecnie jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim:

 - Julia Gabryś: *Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na jakość oocytów klaczy dojrzewających w warunkach in vitro*. Doktorat w trakcie realizacji, dyscyplinie zootechnika i rybactwo, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, UR Kraków.

b) Osiągnięcia organizacyjne

- Jestem członkiem Rady Kierunku Bioinżynieria Zwierząt na kadencję 2022-2024.
- Byłam członkiem Rady Dyscypliny Weterynaria od roku 2019.
- Byłam członkiem Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt w latach 2017-2019.
- Byłam członkiem komitetów organizacyjnych konferencji naukowych;
 - *Biotechnologia i dobrostan w hodowli zwierząt* - Kraków 15-16.06.2015
 - *Innowacyjność badań w naukach o zwierzętach* - Kraków 20-21.06.2013
 - *Aktualne wyzwania naukowe w chowie i hodowli zwierząt* - Kraków 16-18.06.2011
- Byłam organizatorem kursu inseminacji koni – Przegorzały 12-14.05.2017
- Brałam udział w Nocach Naukowców, Festiwalach Nauki, pokazowych lekcjach i wykładach dla licealistów w ramach promocji Wydziału WHiBZ.
- W latach 2012, 2014, 2016 otrzymałam nagrody Rektora UR za działalność organizacyjną.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, kariery zawodowej

a) Praktyczne doświadczenie embriologiczne

Od 2020 r współpracuję jako embriolog kliniczny z Małopolskim Instytutem Leczenia i Diagnostyki Niepłodności, gdzie wykonuję kompleksowo wszystkie procedury embriologiczne. Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii oraz European Society of Human Reproduction and Embryology. Zgodnie z Ustawą o leczeniu niepłodności regularnie biorę udział w szkoleniach ustawicznych dla embriologów. Dotychczas wykonałam około 300 procedur (2000 oocytów) zapłodnienia *in vitro* metodą mikroiniekcji plemnika (ICSI), 20 procedur zapłodnienia oocytów plemnikami pozyskanymi podczas TESE (biopsji jądra), 150 transferów zarodka, 150 transferów zarodka mrożonego, 220 procedur mrożenia oocytów i zarodków, 90 zabiegów „*assisted hatching*”.

W wyniku przeprowadzonych przez mnie procedur uzyskano ponad 80 ciąż, z czego do dnia dzisiejszego urodziło się 40 dzieci. Obecnie jestem również koordynatorem badań naukowych realizowanych w Klinice dotyczących problemu oligozosepmii u mężczyzn i przedwcześnie wygasającej funkcji jajników u kobiet.

c) Kursy i szkolenia

- ✓ Kwalifikacyjny kurs pedagogiczny – KPU.III.II.140/33/06
- ✓ Szkolenia dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz ich przeprowadzenie; dla osób wykonujących procedury; dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach. Certyfikat nr 17/2015

Certyfikaty dające specjalistyczne uprawnienia embriologiczne

- ✓ Certyfikat: *Quality control in IVF laboratory* – Vitrolife , 2012
- ✓ Certyfikat: *In the use of Rapid I vitrification method* – Vitrolife, 2016
- ✓ Szkolenie ustawiczne (Ustawa o leczeniu niepłodności art. 60, DZ.U.z 2017r poz 865) dla embriologów których czynności mają bezpośredni wpływ na jakość i bezpieczeństwo komórek rozrodczych i zarodków. Zaświadczenie nr 107/2021
- ✓ Certyfikat: *Trophoectoderm embryo biopsy and sample loading* – Igenomix-Reproductive Genetics 15-16.10.2021.

b) Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda indywidualna III° za osiągnięcia naukowe w roku 2021, przyznana przez J. M. Rektora Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, dr hab. inż. Sylwestra Tabora.
- Nagroda indywidualna III° za osiągnięcia naukowe w roku 2020, przyznana przez J. M. Rektora Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, dr hab. inż. Sylwestra Tabora.
- Nagroda indywidualna III° za osiągnięcia naukowe w roku 2019, przyznana przez J. M. Rektora Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Prof. dr hab. inż. Włodzimierza Sady.
- Nagroda zespołowa III° za osiągnięcia w dziedzinie organizacyjnej przyznana przez J. M. Rektora Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Prof. dr hab. inż. Włodzimierza Sady-2017.
- Nagroda zespołowa III° za osiągnięcia w dziedzinie organizacyjnej przyznana przez J. M. Rektora Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Prof. dr hab. inż. Włodzimierza Sady-2016.
- Nagroda zespołowa III° za osiągnięcia w dziedzinie organizacyjnej przyznana przez J. M. Rektora Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Prof. dr hab. inż. Włodzimierza Sady -2012.
- Travel Award for Young Scientists – International Congress for Animal Reproduction, Vancouver, Canada - 2012.

8. Podsumowanie dorobku naukowego

Kategoria prac	<i>Przed uzyskaniem stopnia doktora (pierwszy lub korespondencyjny autor)</i>	<i>Po uzyskaniu stopnia doktora (pierwszy lub korespondencyjny autor)</i>	Łącznie <i>(pierwszy lub korespondencyjny autor)</i>
Publikacje w czasopismach z listy JCR	0	36 (10)	36 (10)
Publikacje spoza listy JCR	1(1)	4 (2)	5 (3)
Wykłady plenarne	0	6 (6)	6 (6)
Doniesienia konferencyjne	2 (1)	58 (10)	60 (11)
Rozdziały w monografiach	0	3	3(1)
Redakcje monografii	0	1	1