

Dr Magdalena Gryzińska
Adiunkt
Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin

Załącznik II

AUTOREFERAT W JĘZYKU POLSKIM

Lublin 2014

1. Imię i nazwisko: **Magdalena Gryzińska**

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

- magister inżynier zootechnik, Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Zootechniczny, 29.07.1992 r.
- doktor nauk rolniczych w zakresie zootechniki – genetyki i metod hodowlanych, Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, 16.05.2000, na podstawie rozprawy doktorskiej: „Polimorfizm wybranych białek treści jaja a użytkowość kur”, promotor: prof. dr hab. Antoni Brodacki

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- adiunkt w Katedrze Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza/Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, od 01.09.2000 r. do chwili obecnej
- adiunkt, Studia Podyplomowe Analityka Laboratoryjna w Ochronie Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, od 01.10. 2005 do chwili obecnej
- kierownik, Studia Podyplomowe Genetyka sądowa, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, od 01.10. 2013 do chwili obecnej

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl pięciu publikacji naukowych pod tytułem:

„Zróżnicowanie genetyczne i epigenetyczne wybranych populacji drobiu”

B. Wykaz prac (autor, rok wydania, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa) dokumentujący osiągnięcie naukowe:

- O.1. **Gryzińska M.**, Andraszek K., Jeżewska-Witkowska G., **2014**, Estimation of Global Content of 5-methylcytosine in DNA during Allantoic and Pulmonary Respiration in the Chicken Embryo. *Folia Biologica (Kraków)*, 62 (2), 97-101 [doi: 10.3409/fb62_2.97]
IF₂₀₁₂ - 0,889; IF_{5-Year} - 0,737; pkt. MNiSW - 20
- O.2. **Gryzińska M.**, Andraszek K., Jocek G., **2013**, DNA methylation analysis of the gene CDKN2B in *Gallus gallus* (Chicken). *Folia Biologica (Kraków)*, 61 (3-4), 165-171 [doi: 10.3409/fb61_3-4.165].
IF₂₀₁₂ - 0,889; IF_{5-Year} - 0,737; pkt. MNiSW - 20
- O.3. **Gryzińska M.**, Błaszczak E., Strachecka A., Jeżewska-Witkowska G., **2013**, Analysis of Age-Related Global DNA Methylation in Chicken. *Biochemical Genetics*, 51, 554–563 [doi: 10.1007/s10528-013-9586-9].
IF₂₀₁₂ - 0,938; IF_{5-Year} - 1,065; pkt. MNiSW - 15
- O.4. **Gryzińska M.**, Dziejczak R., Feuereisel J., **2013**, Genetic diversity of pheasants from natural habitat and farm breeding in Eastern Poland. *African Journal of Biotechnology*, 12(18), 2313-2321 [doi: 10.5897/AJB2012.2980].
wg Załącznika do komunikatu MNiSW z dnia 20 grudnia 2012 roku:
IF₂₀₁₂ - 0,570; IF_{5-Year} - 0,366; pkt. MNiSW - 15
Brak w Załączniku do komunikatu MNiSW z dnia 17 grudnia 2013 roku
- O.5. Andraszek K., **Gryzińska M.**, Knaga S., Wójcik E., Smalec E., **2012**, Number and Size of Nucleoli in the Spermatocytes of Chicken and Japanese Quail. *Folia Biologica (Kraków)*, 60 (3-4), 121-127 [doi:10.3409/fb60_3-4.121-127].
IF₂₀₁₂ - 0,889; IF_{5-Year} - 0,737; pkt. MNiSW - 20

Razem (w nawiasie łącznie z publikacją zamieszczoną w *African Journal of Biotechnology*):

- Impact Factor: 3,605 (4,175)
- 5-letni Impact Factor: 3,276 (3,642)
- Punkty MNiSW: 75 (90)

Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku IV, natomiast oświadczenia współautorów w załączniku IX.

C. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO/ARTYSTYCZNEGO WW. PRACY/PRAĆ I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Prace **O.1**, **O.2**, **O.3** i **O.5** dotyczą kur rasy Polbar objętych programem ochrony zasobów genetycznych. Praca **O.1** dotyczy globalnej zawartości 5 metylocytozyny w DNA podczas momentów krytycznych w zarodkach kurzych. Praca **O.2** traktuje o metylacji DNA genu CDKN2B podczas rozwoju embrionalnego, natomiast praca **O.3** dotyczy poziomu globalnej metylacji DNA w zależności od wieku ptaków. Praca **O.4** była efektem współpracy z Zakładem Ekologii Zwierząt i Łowiectwa UP w Lublinie i dotyczyła oceny zróżnicowania genetycznego pomiędzy dwiema populacjami bażanta w Polsce. Natomiast praca **O.5** dotyczy oceny wielkości jąderek i ich liczby w spermatocytach kury i przepiórki japońskiej.

Wprowadzenie

Metylacja DNA to proces przyłączania grup metylowych (CH_3) do zasad azotowych nukleotydów, w szczególności do cytozyny, rzadziej do adeniny. Jest typem modyfikacji DNA, która może zostać odziedziczona lub nabyta, a później usunięta bez zmiany oryginalnej sekwencji DNA. Metylacja DNA jest epigenetyczną modyfikacją, której głównym zadaniem jest aktywowanie i wyciszanie genów. Działa na zasadzie inhibitora promotora genu. Kiedy gen ma być wyciszony, grupa metylowa CH_3 przyłącza się do cytozyny w specyficznych miejscach na nici DNA, zwanych wyspami CpG. Tym samym gen nie może ulec translacji. Proces ten jest odwracalny i w razie potrzeby gen może ulec demetylacji i znów być aktywny. Metylacja DNA najczęściej jest procesem enzymatycznym, zaś demetylacja DNA jest procesem biernym i polega na braku metylacji nici potomnej podczas replikacji. Podczas fazy S cyklu komórkowego zachodzi największa część metylacji DNA nici potomnej, jak również w tej samej fazie może dojść do demetylacji (czyli biernej metylacji). Enzymy przeprowadzające proces metylacji należą do dwóch kategorii: metylotransferaz o aktywności *de novo* i metylotransferaz o aktywności zachowującej wzór metylacji podczas podziałów komórkowych. Natomiast proces nieenzymatycznej metylacji DNA jest wynikiem mutacji (substytucji). Mechanizm wydaje się być bardzo prosty, lecz jego prawidłowy przebieg wymaga wielu czynników, jak na przykład odpowiednie metylotransferazy, białka pomocnicze czy odpowiednia regulacja procesu. W większości przypadków wzór metylacji

DNA jest zapisany w genomie, wyjątek stanowią błędy związane z nieprawidłowościami procesu. Modyfikacje epigenetyczne są odwracalne i wpływają między innymi na stabilność struktury chromatyny, rozwój zarodkowy czy integralność genomu. Epigenom, w przeciwieństwie do genomu ma charakter dynamiczny i jest różnicowany pomiędzy poszczególnymi komórkami, natomiast 5-metylocytozynę w DNA można oznaczyć pod kątem jakościowym (metylacja pojedynczego genu) i ilościowym (całkowita metylacja genomu) [Ehrlich 2003].

Proces kowalencyjnego przyłączenia grup metylowych do cytozyny, bądź adeniny w DNA zmienia powinowactwo DNA do czynników transkrypcyjnych powodując reorganizację nici nukleosomowej. Przebieg metylacji DNA jest skorelowany z wyciszaniem genów, wpływając tym samym na ich ekspresję. Specyficzne DNA-metylotransferazy (DNMT) przenoszą grupy metylowe od donora, którym jest S-adenozylometionina (SAM-CH₃) na piąty atom węgla pierścienia pirymidynowego cytozyny (C5), grupę aminową cytozyny (N4) lub grupę aminową adeniny (N6) przy czym m⁵C występuje u Procaryota i Eucaryota, m⁴C u Procaryota, a m⁶A u Procaryota i u niższych Eucaryota (bezkęgowców) [Wu i Santi 1987; Hattman 2005]. Metylacja DNA jest kluczowa i niezbędna do prawidłowego rozwoju komórek. Wygaszanie ekspresji genów związane jest z dwoma różnymi mechanizmami. Pierwszy mechanizm wymaga obecności metyłowrażliwych czynników transkrypcyjnych, zdolnych do związania się z niezmetylowanymi promotorami genów. Metyłowrażliwe czynniki transkrypcyjne nie wiążą się natomiast z promotorami, gdzie doszło do nieprawidłowej metylacji cytozyny. Metylacja DNA wpływa bowiem na interakcje białko – DNA, prowadząc do zmian w strukturze chromatyny oraz dostępności DNA dla maszyny transkrypcyjnej. Obecność zmetylowanych dinukleotydów CpG w danym promotorze genu, uniemożliwia bezpośrednio przyłączenie się czynników transkrypcyjnych. Drugi mechanizm wymaga obecności białek, które są zdolne do związania określonych zmetylowanych sekwencji DNA, zwanych MBPs (*metyl-CpG-binding proteins* – białka wiążące metylowane CpG). Wyciszanie ekspresji genów związane jest z obniżeniem acetylacji histonów, w którym pośredniczą białka MBPs [Hendrich i Bird, 2000].

Metylacja wysp CpG w regionach promotorowych genów prowadzi często do braku ekspresji tych genów, poprzez zahamowanie transkrypcji. Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, że brak metylacji wysp CpG zawsze uaktywnia ekspresję genów. Odnotowano liczne geny, dla których obserwuje się brak zależności pomiędzy metylacją DNA a transkrypcją [Stawski i in., 2005]. Wykazano słabą zależność pomiędzy ekspresją genów a metylacją dinukleotydów CpG zlokalizowanych w sekwencji kodującej usytuowanej poza

pierwszym egzonem [Łuczak i Jagodziński 2006]. Stwierdzono natomiast, że metylacja cytozyny stabilizuje podwójną helisę DNA, a nawet wpływa na mocniejsze wiązanie DNA z niektórymi białkami [Ashapkin i in., 1995]. Zmiany w nieprawidłowym profilu metylacji DNA mogą prowadzić do stanów patologicznych. U organizmów eukariotycznych metylacja odpowiada między innymi za piętnowanie gamet (imprinting rodzicielski), inaktywację chromosomu X w komórkach samic ssaków łożyskowych, zmiany w konformacji białek oraz regulację ekspresji genów [Lucifero i in., 2004].

Wraz z rozwojem embrionalnym następuje zmetylowanie cytozyny w DNA w poszczególnych genach. Gen *CDKN2B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B) u kur zlokalizowany jest na chromosomie Z wraz z czterema innymi genami: micro-RNA 31 (*miRNA-31*), methylthioadenosine phosphorylase (*MTAP*), cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (*CDKN2B*), tripartite motif 36 (*TRIM36*), oraz protein geranylgeranyltransferase type I, β subunit (*PGGT1B*) [Dorshorst i Ashwell 2009]. Wszystkie są odpowiedzialne za aktywność melaniny w melanocytach [Campo 1991]. Wymieniony gen *CDKN2B* koduje białko podobne do jednego z dwóch cyklinozależnych inhibitorów kinaz występujących u ssaków. W ludzkich keratynocytach białka te są indukowane poprzez cytokinę TGF-beta, która wstrzymuje wzrost komórki w fazie G1 cyklu komórkowego. Dowodzi to, że białko kodowane przez ten gen jest funkcjonalnym odpowiednikiem p16INK4a u ssaków [Dorshorst i Ashwell 2009].

Zmiany epigenetyczne odgrywają istotną rolę we wszelkich przemianach zachodzących w organizmie. Stosunek genów aktywnych do wyciszonych ulega zmianom w różnych okresach rozwoju. U człowieka prawie 100% genów jest aktywnych zaraz po zapłodnieniu, po czym ulegają stopniowemu wyciszeniu, i u starca wartość ta spada poniżej 10%. Bezdyskusyjnym jest fakt, że geny, odpowiedzialne za tworzenie się narządów w okresie embrionalnym muszą zostać wyciszone, ponieważ w przeciwnym przypadku organizm w okresie późniejszym produkowałby dodatkowe organy. Natomiast do grupy genów, które tracą aktywność wkrótce po urodzeniu, należą np. geny potrzebne do syntezy hemoglobiny F czyli hemoglobiny płodowej. Proces wyciszania genów trwa w dalszym ciągu rozwoju prowadząc do optymalnej proporcji genów aktywnych i nieaktywnych w wieku 25 lat. Wkrótce potem grupy genów są wyciszane w procesie starzenia prowadząc do obniżenia produkcji hormonów płciowych, odporności, zapamiętywania, demencji, zmian zapalnych w stawach, przyspieszając miażdżycę tętnic, upośledzając odnowę tkanek (siwienie, łysienie, powstawanie zmarszczek), dlatego też niezbędne jest prawidłowe dziedziczenie kodu epigenetycznego do właściwego przebiegu embriogenezy i funkcjonowania organizmu

człowieka, jak również większości innych organizmów [Burzynski, 2006; Damelin i Bestor 2007]. W genomie zarodka modyfikacje epigenetyczne obejmują dwa główne etapy. Pierwszy etap odbywa się w komórkach zawiązka linii płciowej, natomiast drugi w zarodku w stadium przedimplantacyjnym [Bird 2002]. Komórki zawiązka linii płciowej, gdy znajdują się w grzebieniu płciowym przechodzą demetylację DNA i odziedziczony rodzicielski wzór metylacji zostaje usunięty. Demetylacja DNA zostaje zakończona w komórkach płciowych, kiedy męskie komórki rozrodcze rozpoczynają podziały mitotyczne i mejotyczne [Hajkova i in., 2002]. Różnicowanie płciowe komórek rozrodczych rozpoczyna się, gdy grzebień płciowy zostanie ukształtowany pod względem morfologicznym. Żeńskie komórki rozrodcze rozpoczynają mejozę I, przechodzą przez profazę i zatrzymują się w stadium diplotenu, natomiast męskie komórki rozrodcze przechodzą podziały mitotyczne. Ustalenie nowego wzoru metylacji genomu w komórkach rozrodczych zachodzi po usunięciu już wcześniej istniejącego wzoru. Różnicujący się genom zarodka zostaje przekształcony w matczyński lub ojcowski w zależności od posiadanego zestawu chromosomów. Proces ten następuje przed rozpoczęciem podziałów mejotycznych [Olek i Walter 1997; Allegrucci i in., 2005]. W żeńskich komórkach rozrodczych wzór metylacji zostaje ustalony *de novo* w czasie dojrzewania oocytów, natomiast mechanizm metylacji *de novo* w komórkach rozrodczych męskich nie jest dobrze poznany [Obata i Kono 2002]. Poziom metylacji DNA jest gatunkowo-, tkankowo- i organello-specyficzny. Wykazana zależność pomiędzy poziomem globalnej metylacji DNA a wiekiem organizmu, dotyczy zarówno zwierząt jak i roślin. Dodatkowo u człowieka odnotowano zależność pomiędzy metylacją DNA a wiekiem oraz płcią [Boks i in. 2009]. Doniesienia wielu zespołów badawczych informowały o obniżeniu poziomu metylacji wraz z wiekiem [Vanyushin 2005]. Zaobserwowano również tendencję przeciwną tj. wzrostu metylacji DNA w poszczególnych tkankach wraz z wiekiem organizmu [Kwabi-Addo 2007]. Najnowsze badania donoszą o zależności pomiędzy poziomem metylacji DNA dziecka zaraz po urodzeniu, a wiekiem rodziców. Dowiedzonym jest, że wiek ma wpływ na poziom metylacji DNA w większości organizmów. Poziom metylacji DNA może być wskaźnikiem wieku lub narzędziem do przewidywania długości życia, zaś nieprawidłowa metylacja może prowadzić do przedwczesnego starzenia [Adkins i in., 2011; Bocklandt i in., 2011].

Mechanizmy epigenetyczne mają również wpływ na morfologię jąderek. W komórkach osobników młodych są gładkie, natomiast wraz z wiekiem ich kształt staje się nieregularny. Stwierdzono związek między morfologią jąderek i procesami starzenia komórki. Jąderko jest najlepiej poznany funkcjonalny składnik jądra komórkowego. Odbywa

się w nim synteza i dojrzewanie cząsteczek rybosomalnego RNA (rRNA), jak również łączenie się ich z białkami. Geny dla rRNA znajdują się w określonych chromosomach, w miejscach organizatorów jąderkotwórczych (NOR). Liczba jąderek może być taka sama jak liczba NOR-chromosomów, choć z reguły jest mniejsza [Derenzini i in. 2005]. Geny kodujące rRNA istnieją w dwóch formach. Ich konformacja „otwarta” jest aktywna transkrypcyjnie, natomiast konformacja „zamknięta” jest związana z tzw. procesem załamania transkrypcji. Wyciszaniu mogą ulegać całe rejony NOR lub tylko niektóre geny organizatorów jąderka. Ma to bezpośredni związek z postępującym procesem metylacji związanym z wiekiem organizmu. Jąderka występują w jądrach komórkowych prawie wszystkich komórek eukariotycznych, ponieważ zawierają geny metabolizmu podstawowego, wyjątek stanowią plemniki i dojrzałe erytrocyty ptaków [Raška i in. 2006]. Chociaż zasadniczą funkcją jąderka jest kontrola biogenezy rybosomów, to w ostatnich latach, stwierdzono związek między morfologią jąderek i procesami starzenia się komórki. Kury i przepiórki są organizmami szybko dojrzewającymi o szybkiej rotacji pokoleń. [Gryzińska i Niespodziewański, 2009]. Mogą być z powodzeniem wykorzystywane w badaniach dotyczących procesów starzenia i zmian w strukturach komórkowych zachodzących na skutek starzenia się organizmów

Opisane powyżej przykłady różnorodności dotyczą zmienności epigenetycznej. Organizmy podlegają również zmienności genetycznej, która jest jedną z najważniejszych cech charakteryzujących każdą populację. Różnorodność genetyczna jest podstawą zachowania zdolności adaptacyjnych populacji do zmiennych warunków środowiskowych. Niski stopień zróżnicowania genetycznego może prowadzić do obniżenia zdolności adaptacyjnej populacji [Freeland 2005]. Oszacowanie poziomu zmienności genetycznej jest kluczowe w badaniu populacji i ma ogromne znaczenie dla bioróżnorodności. Na skutek m.in. dryfu i selekcji, zwłaszcza w populacjach o niskiej liczebności, może dojść do znacznego ograniczenia puli genów, wynikiem czego będzie utrata zdolności adaptacyjnych. Dlatego też zalecanie jest monitorowanie zmian w strukturze genetycznej populacji [Weigend i Romanow 2001].

Współczesny model łowieckiego gospodarowania bażantami opiera się na hodowlach zamkniętych i wsiedlaniu do łowisk odchowanych ptaków. W Polsce roczna wielkość produkcji bażantów w hodowlach zamkniętych przekracza 300 tys. ptaków. Przeżywalność bażantów pochodzących z hodowli fermowych nie przekracza 10 %. W sezonie polowań na bażanty najwyższy odsetek kogutów pochodzących z wsiedleń był w listopadzie, a w lutym wśród odstrzelonych bażantów znajdowały się koguty, które nie pochodziły z ostatnich wsiedleń. Łowiecki model gospodarowania bażantami w Polsce akceptuje wsiedlenia ptaków

z hodowli zamkniętych, ale też popiera eksploatację populacji w terenach gdzie nie prowadzi się wsiedleń z hodowli zamkniętych. Po wypuszczeniu ptaków z zamkniętych hodowli występuje duża śmiertelność, i tylko niewielka część z nich przeżywa. Porównanie zmienności genetycznej bażantów pochodzących z fermy i z terenów gdzie nie prowadzono wsiedleń wydaje się być interesującym problemem w aspekcie naukowym jak i praktycznym.

Cele naukowe

- Określenie globalnego poziomu 5-metylocytozyny w DNA w szóstym dniu inkubacji podczas oddychania omocznego oraz w osiemnastym dniu inkubacji w trakcie oddychania płucnego w zarodkach kurzych
- Określenie metylacji genu CDKN2B zlokalizowanego na chromosomie Z w locus *bar* u kur rasy Polbar w 6 i 12 dobie rozwoju embrionalnego, za pomocą techniki MSP.
- Określenie poziomu globalnej metylacji DNA w zależności od wieku kur z wykorzystaniem ilościowej techniki pomiaru względnego poziomu metylacji DNA.
- Określenie liczby i wielkości jąder w spermatocytach kury i przepiórki japońskiej.
- Określenie zróżnicowania genetycznego dwóch populacji bażantów (jedna populacja pochodziła z fermy, natomiast druga z terenów gdzie nie prowadzono wsiedleń w dłuższym przedziale czasowym).

Uzyskane wyniki badań

W pracy **O.1** dokonano oceny globalnego poziomu 5-metylocytozyny w DNA w szóstym dniu inkubacji podczas oddychania omocznego oraz w osiemnastym dniu inkubacji w trakcie oddychania płucnego w zarodkach kurzych rasy Polbar. Postawiono hipotezę o zróżnicowanym poziomie całkowicie zmetylowanego DNA podczas rozwoju embrionalnego z uwzględnieniem kluczowych momentów związanych z oddychaniem. Stwierdzono, że poziom całkowitej metylacji DNA wzrasta wraz z wiekiem embrionów kur Polbar. Poziom całkowitej metylacji DNA w 6 dniu inkubacji, jako względny poziom metylacji w próbkach w stosunku do zmetylowanej kontroli wyniósł 5,77%, natomiast w 18 dniu inkubacji 17,8%. Różnica pomiędzy średnimi była istotna statystycznie. Reakcje metylacji i demetylacji są niezwykle specyficzne i związane z określonymi etapami rozwoju danego organizmu. Metylowana cytozyna jest ważnym epigenetycznym czynnikiem regulującym aktywność genów odpowiedzialnych za proces różnicowania.

Globalny poziom 5-metylocytozyny w DNA podczas oddychania płucnego był wyższy niż w trakcie oddychania omocznego. Analiza wskazuje wyraźną zależność między etapem rozwoju osobniczego, a globalnym poziomem 5-metylocytozyny w DNA.

W pracy **O.2** opisano znaczenie metylacji DNA podczas ekspresji genów w trakcie rozwoju. Podczas rozwoju zarodkowego w stadium wczesnego embrionu następuje redukcja poziomu metylacji (tzw. globalna demetylacja). Powoduje to aktywowanie wszystkich genów niezbędnych do różnicowania komórek. Po implantacji zarodka następuje fala metylacji *de novo* większości cytozyn zlokalizowanych w dinukleotydach CpG, a wzory metylacji zmieniają się w poszczególnych stadiach rozwojowych. Po zapłodnieniu zygota, jak również rozwijający się zarodek posiadają odziedziczony po obojgu rodzicach wzór modyfikacji epigenetycznych. Metylacja DNA utrzymywana jest w komórkach somatycznych oraz w komórkach linii zawiązków płciowych podczas migracji do rozwijających się gonad. Przed fuzją przedjądrzy w genomie ojcowskim zachodzi natychmiastowa i całkowita demetylacja, natomiast w genomie matczym demetylacja następuje stopniowo podczas pierwszych podziałów komórkowych. Równy poziom hipometylacji genomów zostaje osiągnięty na etapie 16 – komórkowego zarodka. Następnie genom zarodka ulega ponownej metylacji *de novo* po implantacji w stadium blastocysty. Dane literaturowe odnoszą się przede wszystkim do ssaków. Wykorzystanie w badaniach *Gallus gallus domesticus* nie było przypadkowe, ponieważ jest to organizm modelowy stosowany w badaniach biomedycznych, ewolucyjnych, genomice porównawczej oraz w badaniach epigenetycznych.

W pracy sformułowano hipotezę badawczą: metylacja DNA w genie *CDKN2B* zmienia się wraz z rozwojem embrionalnym. Metodą MSP (methylation-specific PCR) określono profil metylacji genu *CDKN2B* zlokalizowanego na chromosomie Z w locus *bar* u kur rasy Polbar (*Gallus gallus domesticus*) w 6 i 12 dobie rozwoju embrionalnego. Ujawniony na elektroforogramach produkt reakcji MSP świadczył o braku zmetylowania genu *CDKN2B*. Intensywnie świecące prążki produktu MSP w których użyto starterów niezmetrylowanych dowodzą, że amplifikowany fragment był jednoznacznie niezmetrylowany. Całkowity brak produktu amplifikacji, przy zastosowaniu starterów powielających zmetylowany wariant badanego fragmentu DNA (173pz) w 6 dobie rozwoju oraz obecność bardzo słabego produktu amplifikacji w 18 dobie rozwoju embrionalnego może świadczyć o niewielkim odsetku zmetylowanych cytozyn w badanym fragmencie DNA w późniejszym etapie rozwoju embrionalnego. Oznacza to, że w danych etapach rozwoju embrionalnego gen ten jest w dużym stopniu aktywny.

W pracy **O.3** wykazano zależność pomiędzy metylacją DNA a wiekiem organizmu. Rozwój osobniczy to proces niezwykle uporządkowany i złożony, zaczynający się w stadium totipotencjalnej zygoty i prowadzący do wykształcenia wielu typów wyspecjalizowanych komórek tworzących tkanki i narządy, będące strukturalną i funkcjonalną całością. W trakcie embriogenezy nie następuje utrata genów, dlatego przyczyną różnic między komórkami jest różnie działający wzór ekspresji genów i dla każdej z komórek wzór jest ten ściśle określony. Metylacja DNA jest przykładem modyfikacji, która odgrywa istotną rolę w powstawaniu i rozwoju organizmu, jak również w jego prawidłowym funkcjonowaniu.

Celem niniejszych badań było określenie poziomu globalnej metylacji DNA w zależności od wieku kur rasy Polbar z wykorzystaniem ilościowej techniki pomiaru względnego poziomu metylacji DNA, wzorowanej na teście immunoenzymatycznym. Badania przeprowadzone na ssakach potwierdziły zależność metylacji od wieku organizmu. Natomiast współczesna wiedza na temat wpływu wieku na poziom metylacji DNA u ptaków pozostaje znikoma. Dlatego też sformułowano hipotezę badawczą: całkowity poziom metylacji DNA u kur rasy Polbar ulega zmianie wraz z wiekiem organizmu. Badania przeprowadzono dla dwóch okresów rozwojowych - embrionalnego i postembrionalnego. Materiał do analiz (w zależności od okresu rozwojowego) był pobierany z różnych tkanek. Ponieważ metylacja DNA jest procesem tkankowo specyficznym, dlatego też analizę przeprowadzono oddzielnie dla poszczególnych tkanek. W okresie embrionalnym odnotowano istotnie statystyczny wzrost poziomu metylacji DNA. Natomiast w okresie postembrionalnym całkowity poziom metylacji DNA malał istotnie statystycznie w przyjętych przedziałach czasowych (pomiędzy osobnikami w pierwszym dniu po wykluciu oraz 32 tygodniowymi).

W pracy **O.4** przedstawiono wyniki badań dotyczące zróżnicowania genetycznego bażantów (*Phasianus colchicus*). Postawiono hipotezę o genetycznym uwarunkowaniu przeżywalności bażantów pochodzących z hodowli fermowej. Porównano dwie grupy bażantów. Pierwszą grupę stanowiły ptaki żyjące w naturalnym siedlisku w środkowo-wschodniej Polsce, gdzie nie prowadzono wsiedleń bażantów z fermy w dłuższym przedziale czasowym. Łowieckie gospodarowanie było skupione na kształtowaniu dobrych warunków siedliskowych, optymalnej bazy pokarmowej i niewielkim odstrzale kogutów. Drugą grupą były ptaki chowane na fermie i z tej fermy odchowane bażanty były wsiedlane na terenie środkowo-wschodniej Polski. Badania poza wartością poznawczą mają znaczenie dla udoskonalenia praktyk hodowlanych stosowanych w gospodarce łowieckiej. Materiał do badań z obu grup pobrano w tym samym terminie. DNA izolowano z piór. Zastosowano

metodą losowej amplifikacji polimorficznego DNA, należąca do popularnych i często używanych metod do oceny bioróżnorodności, która poza identyfikacją genotypów pozwala oszacować występowanie między nimi genetycznego zróżnicowania i pokrewieństwa. Możliwość przyżyciowego pobierania materiału do badań, bez jakiegokolwiek ingerencji oraz izolacja genomowego DNA z piór, łatwość jej przeprowadzania i szybka weryfikacja wyników sprawiają, iż jest jedną z najbardziej przydatnych technik w ocenie genetycznej populacji.

Na podstawie analizy zebranego materiału stwierdzono obecność pewnych charakterystycznych prążków występujących u większości badanych dziko żyjących i hodowlanych osobników. Bażanty żyjące w naturalnym siedlisku gdzie nie było wsiedlanych osobników z fermy charakteryzowały się większym polimorfizmem co objawiało się większą ilością fenotypów. Liczba fenotypów specyficznych tylko dla bażantów z naturalnego siedliska dla pierwszej pary starterów była dwukrotnie większa niż pochodzących z fermy. Dla drugiej pary starterów różnica była trzykrotna. Pierwotne pochodzenie bażantów żyjących w naturalnym siedlisku jest fermowe. Tym samym zróżnicowanie genetyczne pomiędzy dwiema grupami bażantów może być efektem selekcji naturalnej.

Celem pracy **O.5** była analiza liczby i wielkości jąderek w spermatocytach *Gallus gallus domesticus* and *Coturnix coturnix japonica*. Postawiono następującą hipotezę: liczba jąderek jest równa lub mniejsza od liczby NOR-chromosomów. W komórkach kogutów kury i przepiórki obserwowano zmienność liczby i wielkości jąderek zarówno wewnątrz osobniczą jak i między osobnikami. U poszczególnych osobników liczba jąderek wahała się od 1 do 4 u kur i od 1 do 2 u przepiórki. Jąderka klasyfikowano jako duże lub małe. W komórkach każdego z badanych samców stwierdzono przewagę jąderek małych - 66% dla *Gallus* i 88% dla *Coturnix*.

Podsumowanie wyników badań

Dowiedziano, że metylacja DNA jest procesem zależnym od wieku. W jaki sposób wiek wpływa na obniżenie, bądź podwyższenie poziomu metylacji DNA w tkankach i organach różnych organizmów jest jeszcze nie do końca wyjaśnione i wymaga dalszych badań. Poziom całkowitej metylacji DNA wzrastał wraz z wiekiem embrionów kur Polbar, a malał wraz z wiekiem osobników w okresie postembrionalnym. Metylowana cytozyna jest ważnym epigenetycznym czynnikiem regulującym aktywność genów odpowiedzialnych za proces różnicowania. Badania zależności poziomu globalnej metylacji DNA od wieku kur rasy Polbar nie tylko poszerzają wiedzę na temat epigenomu tego gatunku, ale przyczyniają

się do poszerzenia ogólnej wiedzy na temat działania mechanizmów epigenetycznych. Mogą stanowić podstawę do kontynuowania pracy nad poznaniem tych mechanizmów u pozostałych gatunków zwierząt. Określenie poziomu zmetylowania cytozyny w DNA może być w przyszłości wyznacznikiem wieku, a nawet narzędziem do przewidywania długości życia.

Badania wykazały, że gen *CDKN2B* nie jest wyciszony w 6 i 12 dobie rozwoju embrionalnego kur Polbar. Jako jeden z pięciu genów odpowiedzialnych za aktywność melaniny w melanocytach, będąc w znacznym stopniu aktywny, może przyczyniać się do produkcji tego barwnika. Badania metylacji DNA genu *CDKN2B* u kur Polbar wprowadzają informacje na temat epigenetycznych mechanizmów autoseksingu tego gatunku oraz ogólną wiedzę na temat działania mechanizmów epigenetycznych u ptaków. Powyższy gen nie jest wyciszony w badanych okresach, co może sprzyjać aktywnej produkcji melaniny w melanocytach, a tym samym różnicować kurki od kogutków w pierwszej dobie po wykluciu. Istotne wydaje się również określenie profilu metylacji DNA genów zlokalizowanych na chromosomie Z w locus *bar*. Metylacja może mieć związek z identyfikacją płci na podstawie barwy upierzenia piskląt.

W odniesieniu do jąderek, w miarę starzenia się organizmu zmienia się przede wszystkim kształt jąderka. Komórki młode mają jąderka gładkie a w miarę starzenia się organizmu, kształt jąderek staje się nieregularny. Natomiast potwierdzono regułę liczby jąderek u przepiórki (liczba jąderek jest równa lub mniejsza od liczby aktywnych NOR), natomiast w komórkach kur liczba jąderek przewyższała liczbę aktywnych NOR opisanych dla *Gallus gallus domesticus* (przyczyną zróżnicowania może być występująca u kur trisomia, dotycząca 16 pary chromosomów).

Stwierdzono występowanie polimorfizmu DNA w przypadku bażantów. W obu przeprowadzonych reakcjach metodą losowej amplifikacji polimorficznego DNA z różnymi parami starterów uzyskano podobne wyniki. Wyróżniono osobniki zdecydowanie do siebie podobne oraz najmniej podobne. Pierwotne pochodzenie bażantów żyjących w naturalnym siedlisku jest fermowe i obecne zróżnicowanie genetyczne pomiędzy dwiema grupami ptaków można interpretować jako efekt selekcji naturalnej. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono zróżnicowanie genetyczne pomiędzy dwiema populacjami bażantów pochodzących z różnych środowisk (naturalnego i fermowego).

Piśmiennictwo (wybrane pozycje)

1. Adkins R.M., Thomas F., Tylavsky F.A., Kruskal J. (2011) Parental ages and levels in the DNA methylation the newborn are correlated. *BMC Medical Genetics* 12, 47-59.
2. Allegrucci A., Thurston A., Lucas E. (2005) Epigenetics and the germline. *Reproduction* 293, 1068 - 1070.
3. Ashapkin V.V., Antoniv T.T., Vanhushin B.F. (1995) Methylation-dependent binding of wheat nuclear proteins to the promotor region of ribosomal RNA genes. *Gene*. 157, 273-277.
4. Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16, 6 – 21.
5. Bocklandt S., Lin W., Sehl M.E., Sanchez F.J., Sinsheimer J.S., Horvath S., Vilain E. (2011). Epigenetic predictor of age. *PLOS One* 6, 1-6.
6. Boks M.P., Derks E.M., Weisenberger D.J., Strengman E., Janson E., Sommer I.E., Kahn R.S., Ophoff R.A. (2009) The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLOS one* 8, 1-8.
7. Burzynski S.R. (2006) Age management treatments which target silenced genes. *Gene silencing: New research*. Nova Science Publishers, 33-80.
8. Campo J.L. (1991) Use of the sex-linked barring (B) gene for chick sexing on an eumelanotic columbian background. *Poultry Science* 70, 1469-73.
9. Damelin M. i Bestor T.H. (2007) Biological functions of DNA methyltransferase1 require its methyltransferase activity. *Molecular Cell Biology* 27, 3891–3899.
10. Derenzini M., Pasquinelli G., O'Donohue M.F., Ploton D., Thiry M. (2005) Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 131–145.
11. Dorshorst B. J., Ashwell C.M. (2009) Genetic mapping of the sex-linked barring gene in the chicken. *Poultry Science* 88, 1811-1817.
12. Ehrlich M. (2003) Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *Journal of Cell Biochemistry* 88, 899-910.
13. Freeland J. (2005) *Molecular Ecology*. Ed.: John Wiley and Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England.
14. Gryzińska M., Niespodziewański M. (2009) Jak powstawała autoseksingowa rasa kur polbar (Pb). *Wiadomości Zootechniczne* 1, (260), 31-35.
15. Hajkova P., Erhardt S., Lane N. (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cell. *Mechanisms of Development* 117, 15 – 23.
16. Hattman S. (2005) DNA-Adenine Methylation in lower Eucaryotes. *Biochemistry*, 70, 550 – 558.
17. Hendrich B., Bird A. (2000) Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 249, 55 – 74.
18. Kwabi-Addo B., Chung W., Shen L., Ittamann M., Wheeler T., Jelinek J., Issa J.P. (2007) Age-related DNA methylation changes in normal prostate tissues. *Clinical Cancer Research* 13, 3796-3802.
19. Lucifero D., Mann M.R., Bartomeli M.S., Trasler J.M. (2004) Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Human Reproduction Update* 10, 3-18.
20. Łuczak M.W. i Jagodziński P.P. (2006) The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 44, 143-154.
21. Obata Y., Kono T. (2000) Maternal primary imprintings is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *Biological Chemistry* 15277, 5285 – 5289.
22. Olek A., Walter J. (1997) The pre – implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nature Genetics* 17, 275 – 276.
23. Raška I., Shaw P.J., Cmarko D. (2006) New insights into nucleolar architecture and activity. *Int. Rev. Cytol.* 255, 177-235.
24. Stawski K., Dąbrowska G., Goc A. (2005) Współzależność pomiędzy metylacją cytozyny i modyfikacjami chromatyny. *Postępy Biologii Komórki* 4, 679-696.
25. Vanyushin B.F. (2005). Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry* 70, 488-499.
26. Weigend S., Romanov M.N. (2001) Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources. *World's Poultry Science Journal* 57, 275-288.
27. Wu J.C. I Santi D.V. (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 262, 4778-4786.

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Kierunki mojej pracy badawczej wynikają z własnych zainteresowań naukowych i wpisują się w tematykę badań prowadzonych w Katedrze Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Podczas pracy naukowej kierowałam projektem badawczym dotyczącym zróżnicowania płciowego cech biochemicznych i morfologicznych kur rasy Polbar podczas ontogenezy. Tematyką moich badań było określenie zróżnicowania płciowego cech morfologicznych, biochemicznych, aktywności wybranych enzymów, zawartości mikroelementów oraz kwasu dezoksyrybonukleinowego. Zagadnieniem tym zajmowałam się również po ukończeniu projektu badawczego rozszerzając go do innych gatunków zwierząt.

A. Polimorfizm białek treści jaja (białka i żółtka)

Dotychczasowe badania zawartości frakcji białkowych koncentrowały się głównie na ich identyfikacji oraz określeniu polimorfizmu. Nieliczne dotyczyły również przyporządkowania zawartości poszczególnych frakcji zwierzętom reprezentującym różne grupy wiekowe i stany fizjologiczne. W badaniach dotyczących frakcji białkowych (albumin, postalbumin, pretransferyn, transferyn i posttransferyn) żółtka i białka jaja stwierdzono, że wiek i stan fizjologiczny zróżnicowały względny poziom frakcji białkowych. Wskazano na celowość badań zawartości frakcji białkowych w powiązaniu z ich użytkowością (praca **II.D.1**). Stwierdzono trzy typy ovoglobuliny G-4 w białku jaja oraz wykazano związek pomiędzy szybko migrującym szerokim pasmem G-4-A i wyższą masą jaja w porównaniu do wolnomigrującego pasma G-4-B u kur ras Zielononóżka kuropatwiana, Sussex i Rhode Island Red. W badaniach dotyczących zmienności frakcji białek żółtka jaja określono zależność pomiędzy polimorficznymi formami prealbumin a masą jaja oraz jakością skorupy u kur rasy Sussex (**II.D.2**). Obserwowane zależności mogą być wykorzystane w selekcji kur tej rasy w celu poprawy jakości skorupy i masy jaja. Natomiast w kolejnej pracy (**II.D.3**) określono zależność pomiędzy polimorfizmem wybranych białek żółtka i białka jaja a użytkowością sześciu ras kur. Stwierdzono istotną zależność między fenotypowymi formami białek treści jaja i cechami użytkowymi. Polimorficzność oraz związek z cechami użytkowymi wskazuje, że znaczenie praktyczne w genetycznym doskonaleniu badanych rodów pod względem cech

użytkowych mogą znaleźć białka z podregionu szybko migrujących prealbumin Pa-F w żółtku oraz owoglobulin G₄ w białku jaja. Uzyskane wyniki wskazują, że polimorficzne formy białek żółtka i białka jaja mogą być wykorzystywane w selekcji kur uzupełniając programy hodowlane.

B. Ocena zróżnicowania genetycznego i epigenetycznego populacji wybranych gatunków zwierząt

Zróżnicowanie genetyczne kur rasy Polbar i Zielononózka kuropatwiana oceniano na podstawie polimorfizmu wybranych sekwencji mikrosatelitarnych i losowej amplifikacji fragmentów DNA. Ocenę zmienności genetycznej w oparciu o wyniki polimorfizmu mikrosatelit obliczono na podstawie współczynnika heterozygotyczności dla jednego locus, charakteryzującego zmienność genetyczną populacji oraz współczynnika polimorfizmu PIC dla loci mikrosatelitarnych (praca **III.B.19**). W pracy **III.B.13** stwierdzono występowanie polimorfizmu u kur rasy Zielononózka kuropatwiana. Odnotowano występowanie od dwóch do piętnastu prążków położonych na wysokości od około 200 do około 1000 pz. Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono występowanie charakterystycznych dla większości osobników prążków na wysokości około 300-350 pz. W populacji objętej badaniem określono występowanie szesnastu różnych fenotypów. Natomiast w doświadczeniu dla rasy Polbar (praca **III.B.15**) kury podzielono na grupy w zależności od fenotypowego wzoru prążkowego. Z dokumentacji fermy zebrano dane dotyczące użytkowości kur. Stwierdzono ścisłą korelację między wyróżnionym fenotypem a użytkowością, w tym przypadku była to masa jaja.

W pracy **II.A.5** badano wpływ amfoterycyny B (AmB) na poziom metylacji DNA u pszczoł. Amfoterycyna B jest antybiotykiem stosowanym u ludzi w leczeniu grzybicy. Niestety, tworzy złoże w wątrobie, nerkach i mózgu. Podobną zależność odkładania AmB zaobserwowano u pszczoły (w przewodzie pokarmowym). Z tego względu jak również ze względu na skrajnie różne formy fenotypowe (matka, truteń, robotnica) pszczoły są dobrym organizmem modelowym do badania mechanizmów epigenetycznych. W trakcie pracy postawiono następującą hipotezę badawczą: amfoterycyna B wpływa na poziom globalnej metylacji DNA u pszczoł. Dwom grupom pszczoł w klatkach podawano syrop cukrowy z dodatkiem amfoterycyny B (AmB) w różnych dawkach, natomiast grupa kontrolna otrzymywała tylko syrop cukrowy. Am B jest związkiem chemicznym pochodzenia naturalnego, i może wywoływać liczne objawy niepożądane. W doświadczenie AmB

wpłynęła na skrócenie długości życia pszczoł oraz obniżała poziom globalnej metylacji DNA w porównaniu do grupy kontrolnej. Stwierdzono, że AmB u pszczoły wpływa na kontrolę epigenetyczną poprzez zmniejszenie globalnego poziomu metylacji DNA, prawdopodobnie przez zakłócanie równowagi metylacji/demetylacji. Podobną współzależność obserwowano dla innego organizmu modelowego *Arabidopsis thaliana*, po podaniu kanamycyny. W przeprowadzonym doświadczeniu AmB wpłynęła nie tylko na poziom globalnej metylacji DNA, ale również na długość życia pszczoł. Starzenie się jest złożonym procesem związanym z istotnymi zmianami wielu kluczowych szlaków metabolicznych, a pszczoła jest organizmem modelowym stosowanym w gerontologii. Dlatego też przyspieszone starzenie może być uważane jako efekt uboczny leczenia AmB (prawdopodobnie również efekt uboczny leczenia innymi antybiotykami).

Praca **II.D.18** dotyczy roli metylacji DNA w regulacji ekspresji genów. Metylacja wpływa na oddziaływanie DNA z czynnikami transkrypcyjnymi oraz polimerazami DNA. Zmetylowana cytozyna, działając jak „przełącznik” decyduje, który gen ma być transkrybowany. Działa szczególnie silnie na regiony promotorowe, co prowadzi do obniżonej ekspresji w określonym etapie rozwoju tkanek organizmu. U niższych Eukariota metylacja cytozyny jest dość rzadka, ale u kręgowców około 10% cytozyn w genomie jest zmetylowanych, a u roślin nawet do 30%. Ponadto temu procesowi podlegają w większości cytozyny wchodzące w skład dinukleotydu CpG. Metylacja DNA następuje natychmiast po replikacji, w miejscach komplementarnych do zmetylowanych cytozyn na nici DNA służącej za matrycę. Dorosłe komórki mają ustalony wzór metylacji promotorów genów, który zmienia się wraz z wiekiem organizmu. W okresie embrionalnym (*de novo*) wszystkie geny są demetylowane, gdyż nowo tworzony organizm, różnicując tkanki, musi posiadać geny aktywne. Później są one blokowane, gdy ich ekspresja nie jest już potrzebna. Natomiast praca **II.D.20** dotyczy detekcji zmetylowanej cytozyny w DNA. Metody biologii molekularnej pozwalają na analizę metylacji całego genomu jak i poszczególnych genów. Obecnie istnieje stosunkowo wiele technik, umożliwiających jakościowe i ilościowe oznaczanie 5-metylocytozyny. Można je podzielić i sklasyfikować według zakresu analizowanego materiału (analiza m⁵C w całym genomie lub analiza metylacji pojedynczych genów) lub stosowanej techniki. Istnieje wiele metod analizy wzoru metylacji, ale żadna z nich nie jest uniwersalna. Przy wyborze metody, należy wziąć pod uwagę rodzaj, ilość i jakość analizowanego materiału biologicznego oraz dostępność do specjalistycznego sprzętu. Wybrana metoda musi zapewniać powtarzalność wyników i minimalizować kontaminację. Obie wyżej wymienione prace, są pracami przeglądowymi.

C. Badania oceny DNA wykorzystywane w genetyce sądowej

Współpraca nawiązana z pracownikami Zespołu Biologii - Laboratorium Kryminalistycznego - Komendy Wojewódzkiej Policji w Lublinie przyczyniła się do badań nad oceną wydajności izolacji DNA z materiału biologicznego (różnorakiego pochodzenia) przechowywanego w różnych warunkach. Wynikiem współpracy są publikacje **II.D.21**, **II.D.23** i **II.D.24**. Izolowanie kwasów nukleinowych jest wstępnym i podstawowym etapem w wielu procedurach z zakresu biologii molekularnej, diagnostyki, a także medycyny sądowej mającym krytyczne znaczenie w ich dalszym przebiegu. Głównym celem tego etapu jest uzyskanie wysokiej jakości i czystości DNA, niezależnie od źródła jego pochodzenia. W przypadku przyżyciowego pozyskiwania materiału do izolacji DNA „najwygodniejszą” i najczęściej pobieraną tkanką jest krew obwodowa. Pobrana krew może być przechowywana w odpowiednich warunkach przez wiele lat i może służyć jako źródło DNA. Uzyskany wynik ma decydujący wpływ na podjęcie późniejszych badań. W pracy **II.D.21** celem badań było porównanie ilości i jakości (czystość pod względem zanieczyszczenia białkami, odczynnikami do izolacji oraz zanieczyszczenia drobinami komórkowymi) DNA izolowanego ze świeżej i przechowywanej krwi za pomocą dwóch kitów komercyjnych. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w stężeniu DNA izolowanego różnymi zestawami do izolacji oraz dla krwi świeżej i przechowywanej. Lepszym zestawem do izolacji DNA z krwi był kit Genomic Midi AX w porównaniu z zestawem QIAamp DNA Blood Mini Kit, natomiast większe stężenie DNA uzyskano z krwi świeżej (**II.D.21**).

Kolejna praca (**II.D.23**) dotyczyła porównania koncentracji DNA, wyizolowanego z materiału biologicznego różnego pochodzenia (krew, pióro, kałomocz) od kur. Określono jakość DNA oznaczając zanieczyszczenia białkami, odczynnikami do izolacji oraz drobinami komórkowymi. Większość danych pochodzących z piśmiennictwa prezentuje rutynowo dwa parametry dotyczące izolatów DNA, a mianowicie jego stężenie oraz zanieczyszczenie białkami. Bardzo ważnym parametrem często pomijanym w doniesieniach naukowych jest zanieczyszczenie próbek DNA odczynnikami do izolacji. Zanieczyszczenia te mogą hamować działanie polimerazy DNA i enzymów restrykcyjnych. W ocenie spektrofotometrycznej istotne znaczenie ma droga optyczna kuwety, ponieważ przy 10 mm, nie zawsze możliwy jest pomiar badanych parametrów DNA. Celem pracy było określenie metodą spektroskopii UV-Vis parametrów DNA wyizolowanego za pomocą dwóch komercyjnych zestawów przy

dwóch drogach przechodzenia wiązki światła przez kuwetę (2 mm i 10 mm) oraz względem dwóch różnych prób ślepych, tj. wody i buforu w którym zostało zawieszono DNA. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w stężeniu DNA izolowanego różnymi zestawami do izolacji. Różnice w stężeniu DNA w izolatach odczytywane przy dwóch próbach zerowych (woda i bufor) nie były istotne. Natomiast w pracy **II.D.24** określono parametry walidacji zestawu AmpFl STR MiniFiler™ wykorzystywanego w genetyce sądowej. Proces weryfikuje metodę, wyznaczając krytyczne aspekty procedury. AmpFl STR MiniFiler™ Kit PCR Reagents jest gotowym do użycia zestawem, zawierającym wszystkie niezbędne odczynniki do wykonania reakcji PCR do jednoczesnej multipleksowej amplifikacji i fluorescencyjnej detekcji fragmentów ludzkiego DNA. DNA wyizolowano z wymazówek ze śluzówki jamy ustnej z zastosowaniem zestawu kolumnkowego QIAGEN. Oznaczenia ilościowego DNA przeprowadzono metodą opartą na Real-Time PCR (Quantifiler® Human DNA Quantification Kit). Wszystkie etapy badań dokonano w obecności kontroli pozytywnych (DNA o znanym profilu) i kontroli negatywnych (próby odczynnikowe) w trzech powtórzeniach. Podczas walidacji zbadano następujące parametry: próg detekcji i próg oznaczalności, liniowość i zakres pomiarowy metody oraz jej czułość. Metoda charakteryzowała się dużą wykrywalnością alleli, ponadto w zakresie od 0,0625 ng do 2,0 ng matrycowego DNA stwierdzono pełne profile DNA. Zjawisko „drop out” pojedynczych alleli oraz całych układów zauważono dla zawartości 0,03125 ng matrycowego DNA w próbce. Zestaw Mini Filer kwalifikuje się do badań czystych profili lub mieszanin, natomiast w mniejszym stopniu do analizy tzw. śladów kontaktowych ze względu na wysoką czułość, która powoduje ujawnianie dodatkowych domieszek DNA. Walidację zakończono wynikiem pozytywnym, ponieważ metoda spełnia stawiane jej wymagania.

D. Badania wykorzystujące techniki cytogenetyczne

Nawiązana współpraca z Katedrą Genetyki i Hodowli Koni, Wydziału Przyrodniczego, Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach przyczyniła się do rozpoczęcia badań wykorzystujących test wymian chromatyd siostrzanych (SCE) oraz analizę jąderek (pod kątem liczby i wielkości) w spermatocytach ptaków. DNA zawarte w chromosomach jest wrażliwe i podatne na uszkodzenia niekorzystnych czynników środowiskowych. W ocenie niestabilności chromosomowej szczególnie czułym testem cytogenetycznym, wykrywającym uszkodzenia DNA, jest test SCE. Daje on odpowiedź w jakim stopniu chromosomy są wrażliwe na czynnik uszkadzający i jakie jest natężenie jego

genotoksycznego działania. Celem badań była analiza częstotliwości wymian chromatyd siostrzanych SCE w chromosomach kur ras Polbar (Pb) i Zielononózka kuropatwiana (Zk). Wyniki dotyczące tego doświadczenia zawarto w pracy **II.A.4**.

Jąderka są produktem aktywności rejonów jąderkotwórczych – NOR (ang. Nucleolar Organizer Regions) określonych chromosomów. Ich zasadniczą funkcją jest formowanie podjednostek rybosomów z cząsteczek białek rybosomalnych. Morfologia jąderka jest zmienna i może podlegać gwałtownym zmianom. Analiza liczby i wielkości jąderek może być wykonywane na poziomie badań cytogenetycznych i służyć jako alternatywne źródło informacji na temat aktywności genów kodującego rRNA i aktywności obszarów jąderkotwórczych (NOR). Wyniki badań zawarto w pracy **III.B.18**. Kontynuując badania w pracy **III.B.29** określono kształt jąderek w spermatocytach przepiórki japońskiej (*Coturnix japonica*) należących do dwóch grup wiekowych. Analizowano jąderka w komórkach pierwszej profazy mejotycznej. Ustalono liczbę i kształt jąderek, które zostały sklasyfikowane jako regularne, nieregularne i zdefragmentowane. W komórkach ptaków młodych nie stwierdzono jąderek zdefragmentowanych. Jąderka regularne i nieregularne stanowiły odpowiednio 97 i 3%. W komórkach ptaków starszych nie obserwowano jąderek regularnych, natomiast jąderka nieregularne i zdefragmentowane stanowiły odpowiednio 37 i 67%.

E. Badania wykorzystujące techniki histologiczne

Istotą badań z tego zakresu było określenie cech morfometrycznych narządów układu rozrodczego (męskiego i żeńskiego) kur rasy Polbar. W celu charakterystyki histologicznej od kur pobrano do utrwalenia jajnik oraz wycinki lejka, magnum, cieśni, macicy i pochwy jajowodu, natomiast od kogutów pobrano prawe jądro z najądrzem i fragment odcinka nasieniowodu z jego środkowej części. Pobrane elementy utrwalono w płynie Bouina. Następnie przeprowadzono procedury histologiczne (barwienie HE oraz zmodyfikowaną metodą trójbarwną Massona, tzw. Masson niebieski). Makroskopowo jądra kogutów rasy polbar nie zmieniły swojego położenia przy brzusznej powierzchni przednich płatów nerki, zachowując naturalny fasolowaty kształt. Ich powierzchnia była barwy jasnorożowej, chociaż u niektórych kogutów jedno lub obydwa jądra były szarobrazowego koloru. Przeważnie lewe jądro było nieco większe niż prawe. Jądra otoczone były łącznotkankową otoczką białawą, która z wiekiem stawała się coraz grubsza. Wewnątrz brak jest odgałęzień tkanki łącznej, dzielącej jądra na zraziki. Kanaliki kręte stanowią większość miąższu zwiększając swoją średnicę z wiekiem, przy czym zmieniają strukturę swej ściany. We wczesnych okresach

życia do 8 tyg. ich ściana zawiera przeważnie spermatogonie, a później w większej liczbie występują kolejne generacje spermatocytów. Zauważono również pomiędzy nimi grupy komórek interstitialnych, a pod błoną białawą komórki Sertoliego. Na preparatach histologicznych nasieniowody charakteryzowały się dosyć grubą trójwarstwową mięśniówką. Wyniki badań zawarto w pracy **II.D.7**. Natomiast wyniki badań dotyczące układu rozrodczego żeńskiego zawarto w pracy **II.D.8**. Jajnik występuje u kur jako pojedynczy narząd (lewy), chociaż u jednodniowych kurek są widoczne pozostałości prawego. W wieku do 12 tyg. życia pęcherzyki nie miały stilków, a zawarte w nich komórki jajowe były barwy perłowej. Histologicznie pęcherzyki jajnikowe tkwiły dość głęboko w zrębie łącznotkankowym i miały w składzie ich ściany dość cienką warstwę komórek ziarnistych (*zona radiata*). Na preparatach histologicznych u osobników w wieku 18 i 33 tyg. obrazy mikroskopowe okazały się identyczne jak opisane przez innych autorów. Pod błoną białawą zauważono pęcherzyki w różnych stadiach rozwoju, których komórki jajowe wypełnione żółtkiem miały tarczki zarodkowe. U 33 tygodniowych kur zaobserwowano wyraźnie ścianę pęcherzyka składającą się z warstwy ziarnistej (*stratum granulosum*), wewnętrznej (*theca folliculi interna*) i zewnętrznej (*theca folliculi externa*) osłonki pęcherzyka oraz osłonki powierzchownej (*tunica superficialis*). U kur w wieku 64 tyg. jajnik był już znacznie zredukowany w odniesieniu do wielkości i struktury warstwy korowej. Na preparatach mikroskopowych duże pęcherzyki tkwiące w korze miały budowę podobną, jak i u 18 i 33-tygodniowych kur. W jajowodzie jednodniowych kurek trudno było określić granice pomiędzy jego składowymi odcinkami, ale u 8 tyg. dość wyraźnie uwypuklał się *uterus*. U badanych kur w wieku od 18 do 64 tygodnia życia widoczna była wyraźnie granica pomiędzy odcinkami jajowodu: lejkiem – częścią główną - cieśnią - częścią skorupkotwórczą - pochwą. Badania histologiczne u jednodniowych kurek wykazały dość wyraźne pofałdowanie śluzówki jajowodu, która wraz z podśluzówką u starszych osobników charakteryzowała się coraz wyższymi kosmkami w porównaniu z śluzówką kurek w wieku 8 i 12 tyg. życia. Budowa ściany jajowodu w każdym odcinku nie wyróżnia się u polbarów pod względem charakterystycznych szczegółów. U kur w wieku 64 tyg. życia, po okresie intensywnej nieśności śluzówka miała bardziej widoczny nabłonek wielorzędowy z wyraźnymi wypustkami (stereocyliami) i dosyć grubą warstwę mięśniową.

Badania wykorzystujące techniki histologiczne prowadziłam również we współpracy z pracownikami Katedry Rybactwa Jeziorowego i Rzecznego oraz Katedry Biologii i Hodowli Ryb Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Celem pracy było zbadanie zmian w jajniku szczupaka *Esox lucius L.* pochodzącego z jezior

Mazuskich. Zmiany te polegały na morfologicznym zniekształceniu części lub całości jajnika. Analiza histologiczna została przeprowadzona w celu sklasyfikowania zaobserwowanych anomalii w jajniku. Zmiany zakwalifikowano do trzech typów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że za anomalie gonad mogą być odpowiedzialne czynniki środowiskowe i/lub czynniki genetyczne. Wyniki badań nie pozwoliły na jednoznaczne ustalenie etiologii zmian. Wyniki badań zawarto w pracy **II.A.8**.

F. Wskaźniki hematologiczne, biochemiczne i mikroelementy krwi u kur i indyków w zależności od wieku lub po zadaniu czynnika doświadczalnego

Współpraca nawiązana z pracownikami Katedry Biochemii i Toksykologii WBiHZ, UP w Lublinie przyczyniła się do rozpoczęcia badań nad oznaczaniem wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi ptaków. Wynikiem współpracy są publikacje (**I.B.9**, **II.D.11**, **II.D.12**, i **II.D.13**), w których celem badawczym było określenie fizjologicznych wartości wybranych wskaźników hematologicznych, poziomu cholesterolu całkowitego, jego frakcji HDL i LDL oraz triglicerydów jak również progesteronu i testosteronu w surowicy krwi kur i kogutów rasy Polbar w ósmym, dwunastym i osiemnastym tygodniu życia. Badania hematologiczne Polarów wykazały wiele istotnych różnic pomiędzy kurami i kogutami. W układzie czerwonokrwinkowym kury uzyskały wyższe od kogutów wartości dla liczby erytrocytów i wskaźnika zróżnicowania objętości krwinek czerwonych, natomiast dla kogutów odnotowano wyższe wartości dla hematokrytu, hemoglobiny i średniego stężenia hemoglobiny w krwince. W układzie białokrwinkowym liczba leukocytów spadała wraz z wiekiem ptaków, zarówno u kur jak i kogutów. Koguty charakteryzowały się wyższym udziałem procentowym limfocytów oraz niższym granulocytów (praca **I.B.9**).

Średnie wartości cholesterolu całkowitego i HDL ulegały wahaniom wraz z wiekiem natomiast stężenie LDL malało, a triglicerydów wzrastało wraz z wiekiem. Kolejne prace dotyczyły stężenia hormonów. Duży wpływ na koncentrację progesteronu i testosteronu w surowicy krwi wywierają zróżnicowane czynniki, w tym także same geny. Niewiele publikacji, a także doniesień na temat stężenia hormonów płciowych w surowicy krwi nastrocza trudności w porównaniu otrzymanych wyników u Polbarów z wynikami u innych ras czy nawet gatunków ptactwa domowego. Hormony steroidowe kur rasy Polbar wykazywały tendencje wzrostowe w surowicy krwi w miarę dojrzewania narządów płciowych odpowiedzialnych za ich produkcję. U kur stężenie progesteronu istotnie zwiększyło się dopiero w 18 tygodniu życia. Natomiast testosteron u kogutów wykazywał

tendencje wzrostowe w miarę dojrzewania narządów płciowych w każdym z badanych okresów. Wyniki stężenia omawianych parametrów, uzyskane od skonsolidowanej genetycznie rasy kur polbar, mogą być wykorzystywane do porównań z innymi rasami. Kontynuacją badań było zbadanie fizjologicznych wartości aktywności katalitycznej enzymu Ca^{+2} -ATPazy w mięśniach. W przeprowadzonych analizach dowiedziono (praca **II.A.6**), iż poziom aktywności ATPazy wapniowej jest zależny od płci i wieku badanych ptaków.

Rozwinięciem tej tematyki były prace dotyczące wpływu zadanego czynnika (czosnku, pochodnej 1,2,4-triazolu, choliny i betainy) na wybrane wskaźniki biochemiczne krwi indyczek. Wyniki zawarto w pracach **II.D.10**, **II.D.17** i **III.B.26**. Wyciąg wodny czosnkowy wpłynął na obniżenie poziomu białka ogólnego, kwasu moczowego, mocznika, bilirubiny, kreatyniny, i albumin w osoczu krwi. Dodatek czosnku wpłynął pozytywnie na efekty odchowu i skład chemiczny tkanek mięśni. Natomiast dodatek choliny i betainy wpłynął na znaczące obniżenie aktywności aminotransferazy asparaginowej i alaninowej oraz wzrost aktywności peroksydazy glutationowej. Przeprowadzone badania sugerują, że zarówno cholina jak i betaina mogą być stosowane w praktyce w celu pobudzania mechanizmów obrony antyoksydacyjnej organizmu.

Kolejne prace dotyczyły zmian zawartości elementów mineralnych u kur i indyków w zależności od wieku lub po zadaniu czynnika doświadczalnego. Wyniki zawarto w pracach **II.A.1** i **III.B.14**. Na poziom wskaźników u ptaków mają wpływ takie czynniki jak gatunek, rasa, wiek, płeć, stan fizjologiczny, technologia chowu, żywienie oraz różnice osobnicze. Brak norm fizjologicznych wskaźników biochemicznych utrudnia interpretacje wyników, zaś dostępne dane literaturowe podają jedynie fragmentaryczne wyniki. Tym bardziej, że wartości wskaźników mineralnych dostępne w tych danych najczęściej odnoszą się do układów doświadczalnych i wpływu zadanych parametrów na te wartości. Jakakolwiek interpretacja wyników bez opracowanych wartości referencyjnych dla kur jest bezzasadna. W ramach przeprowadzonych badań stwierdzono, że dodatek pochodnej 1,2,4-triazolu w istotny sposób wpłynął na zawartość magnezu i fosforu nieorganicznego w osoczu krwi. We wszystkich grupach stwierdzono znaczące obniżenie koncentracji żelaza oraz podwyższenie zawartości cynku. Kolejne badania zamieszczono w pracy **II.D.25** dotyczyły ilościowego oznaczenia wapnia, sodu, potasu i magnezu w surowicy krwi kur i kogutów rasy Polbar podzielonych na trzy grupy wiekowe. Stężenie poszczególnych makropierwiastków było zróżnicowane w poszczególnych grupach. Wyższe średnie stężenie wapnia, magnezu i sodu z trzech badanych okresów uzyskano dla kogutów, natomiast dla kur odnotowano wyższe wartości stężenia potasu. Uzyskane wyniki poziomu składników mineralnych od skonsolidowanej genetycznie

rasy polbar mogą być wykorzystane do porównań innych ras drobiu. Porównanie wskaźników rozszerza możliwości diagnostyczne, co pozwala na kompleksowy monitoring stada.

G. Badania interdyscyplinarne

Kolejne prace powstały we współpracy z pracownikami Zakładu Biologii Eksperymentalnej i Środowiskowej WBiHZ, UP w Lublinie i dotyczyły analizy profilu proteolitycznego powierzchni ciała pszczoły miodnej (*Apis mellifera*). Efektem tej współpracy była publikacja **II.A.2**. Zanieczyszczenie środowiska ma wielkie znaczenie dla białkowej bariery ochronnej na powierzchni ciała pszczoły. Kluczowymi elementami tej bariery są proteazy oraz inhibitory proteazy. Przyczyniają się do ochrony pszczół przed patogenami. Osłabienie tej bariery może doprowadzić do gwałtownego spadku odporności, a nawet śmierci. Porównywano pszczoły pochodzące z zanieczyszczonego i czystego środowiska. Zanieczyszczenie przyczyniło się do pogorszenia bariery proteolitycznej powierzchni ciała pszczół. Pszczoły utrzymywane w czystym środowisku wykazały wyższy poziom aktywności proteaz i inhibitorów proteaz w porównaniu z pszczołami ze środowiska zanieczyszczonego. W kolejnych doświadczeniach (publikacja **II.A.3**) badano aktywność proteolityczną powierzchni ciała pszczoły w różnych stadiach rozwojowych (jajo, larwa, poczwarka i postać dorosła) w różnych porach roku (wiosna, lato, jesień, zima), osobników żywych i martwych (publikacja **II.A.7**), w środowisku klatki i ula (publikacje **II.D.14** i **II.D.15**). U pszczół z ula aktywność proteaz w ciągu całego okresu doświadczonego utrzymywała się na stałym poziomie, natomiast w klatkach podlegała wahaniom.

Magdalena Gryniewicz