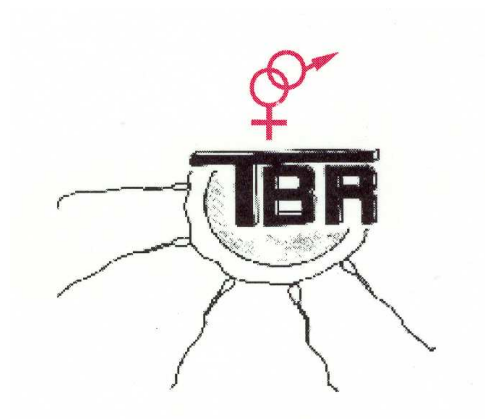


II Zimowa Szkoła TBR
„Centralne i Lokalne Regulacje Procesów Rozrodczych”



STRESZCZENIA

Zakopane 17-19 lutego 2010

Kraków 2010

ORGANIZATORZY

Krakowski Oddział Towarzystwa Biologii Rozrodu
Komitet Biologii Rozrodu Zwierząt, PAN
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytetu Rolniczego
w Krakowie

Redakcja

Dr hab. Andrzej Sechman, prof. UR,
dr hab. Danuta Wrońska-Fortuna, dr inż. Anna Hrabia
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego
w Krakowie

Prof. dr hab. Edward Wierzchoś, dr hab. Dorota Zięba, prof. UR,
dr inż. Edyta Molik
Katedra Hodowli Trzody Chlewnej i Małych Przeżuwaczy Uniwersytetu
Rolniczego w Krakowie

PROGRAM

II Zimowej Szkoły TBR

Zakopane, 17-19 lutego 2010

„CENTRALNE I LOKALNE REGULACJE PROCESÓW ROZRODCZYCH”

Czwartek, 18 lutego 2010

8.30 – 8.45 Otwarcie II Zimowej Szkoły TBR

Sesja plenarna

Przewodniczący: Prof. dr hab. Stanisława Stokłosowa i Prof. dr hab. Adam Zięćik

8:45-9:30 Nafis Rahman

MODEL TRANSGENICZNEJ MYSZY DO BADAŃ OWULACJI, IMPLANTACJI ZARODKÓW I BIOLOGII NOWOTWORÓW

A transgenic murine model to study ovulation, implantation and tumor biology

Sesja 1.

9.30 -11.00 **Od oocytu do zarodka – biotechnologia w rozrodzie zwierząt**

Przewodniczący: Dr hab. Dorota Cieślak, prof. UP

Prof. dr hab. Zdzisław Smorąg

9.30 – 9.45 M.Bryła, M.Trzcińska, J.Wieczorek, B. Gajda, Z. Smorąg
**WPLYW HODOWLI *IN VITRO* I KRIOKONSERWACJI NA
FRAGMENTACJĘ JĄDROWEGO DNA
PRZEDIMPLANTACYJNYCH ZARODKÓW ŚWINI**
Effect of in vitro cultured and cryopreservation on the DNA
fragmentation in preimplantation porcine embryos

9.45 – 10.00 J. Wieczorek, Y. Kosenyuk, B. Rynska, M. Cegla
**KLINICZNY ASPEKT POWTARZALNEJ, LAPAROSKO-
POWEJ METODY OPU U KÓZ**
Clinical aspect of repeatable laparoscopic ovum pick-up (opu) in
goat

10.00 – 10.15 Stanisław Kondracki, Anna Wysokińska, Dorota Banaszewska,
Dorota Sitarz
**CECHY MORFOMETRYCZNE PLEMNIKÓW KNURÓW
RASY DUROC W ZALEŻNOŚCI OD KONCENTRACJI
PLEMNIKÓW W EJAKULACIE**
Morphometrical characteristics of spermatozoa in Duroc boars
with regard to the sperm concentration in an ejaculate

- 10.15 – 10.30 Agnieszka Nowak, Joanna Kochan, Krzysztof Czachura,
Adam Okólski
**WPLYW TETRACHLORODIBENZODIOKSYNY (TCDD)
NA ROZWÓJ IN VITRO OOCYTÓW KLACZY I KROWY**
Effect of tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) on *in vitro* maturation
equine and cattle oocytes
- 10.30 – 10.45 E. Pers-Kamczyc, P. Pawlak, N. Reńska, D. Lechniak
**CZAS PIERWSZEGO PODZIAŁU ZYGOTY WPLYWA NA
CZĘSTOŚĆ ZABURZEŃ CHROMOSOMOWYCH W
ZARODKACH BYDŁA POZYSKANYCH IN VITRO**
Timing of the first zygotic cleavage affects the ratio of
chromosomally abnormal bovine embryos produced in vitro
- 10.45 – 11.00 M. Trzcńska, M. Bryła, J. Wieczorek, B. Gajda,
B. Szczęśniak-Fabiańczyk, Z. Smorąg
**WYKRYWANIE I OCENA WPLYWU APOPTOZY NA
ZDOLNOŚĆ ZAPŁADNIAJĄCĄ PLEMNIKÓW KNURA**
Detection and evaluation of the effect of apoptosis on the fertilizing
capacity of boar spermatozoa

11.00 – 11.30 Przerwa na kawę

Sesja 2.

11.30 -13.00 Centralna i obwodowa regulacja uwalniania GnRH

Przewodniczący: Prof. dr hab. Krystyna Kozić

Prof. dr hab. Jolanta Polkowska

11.30 – 11.45 Jolanta Polkowska

SIŁA KISSPEPTYNY W PROCESACH ROZRODU

A powerful signal of kisspeptin in reproduction

11.45 – 12.00 A. Herman, T. Misztal, D. Tomaszewska-Zaremba

**WPLYW CENTRALNEGO PODANIA IL-1 β NA
EKSPRESJĘ GENU GnRH W PODWZGÓRZU I NA
SEKRECJĘ HORMONÓW GONADOTROPOWYCH LH I
FSH U ANESTRALNYCH OWIEC**

Effect of IL-1 β central injection on GnRH gene expression in the
hypothalamus and gonadotropins' secretion in anestrus ewes

12.00 – 12.15 Marta Wańkowska, Anna Wójcik-Gładysz, Tomasz Misztal,
Katarzyna Romanowicz, Jolanta Polkowska

**WPLYW HORMONÓW JAJNIKOWYCH NA
PODWZGÓRZOWO-GONADOTROPOWE MECHANIZMY
ROZWOJU JAGNIĄT SSĄCYCH W CZASIE ODCHOWU**

Effects of ovarian hormones on the hypothalamo-gonadotrophic mechanisms of development in sucking-lambs during the rearing period

- 12.15 – 12.30 Lidia Martyńska, Ewa Wolińska – Witort, Magdalena Chmielowska, Wojciech Bik, Elżbieta Wasilewska – Dziubińska, Jerzy Elbanowski, Bogusława Baranowska
WPLYW DOKOMOROWEJ INFUZJI OREKSYNY-A NA POZIOM GONADOTROPIN U DOJRZAŁYCH SAMIC SZCZURA
Effect of intracerebroventricular infusion of orexin-A on plasma gonadotrophins levels in mature female rats
- 12.30 – 12.45 Nina Smolińska, Anna Nitkiewicz, Jadwiga Przała, Tadeusz Kamiński
KONCENTRACJA BIAŁKA RECEPTORA OREKSYNY TYPU 2 W PRZYSADCE ŚWIŃ W CZASIE CYKLU RUJOWEGO
Orexin type 2 receptor protein expression in the porcine pituitary gland during the oestrous cycle
- 12.45 – 13.00 Elżbieta Wasilewska-Dziubińska, Alina Gajewska, Anna Herman, Ewa Wolińska-Witort, Magdalena Chmielowska, Lidia Martyńska, Kazimierz Kochman
WALPROINIAN SODU (VPA) HAMUJE ZALEŻNE OD GNRH UWALNIANIE LH Z KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI SAMICY SZCZURA *IN VITRO* NIEZALEŻNIE OD WPLYWU NA AKTYWNOŚĆ SZLAKU IP₃/PKC

13:00-13:45 Sesja plakatowa nr I (grupy tematyczne 1-4)

Przewodniczący: Dr hab. Dorota Zięba, prof. UR

Dr hab. Tomasz Misztal

13.45-14.30 Obiad

Sesja 3.

14.45 - 16.15 Oddziaływanie ksenobiotyków środowiskowych na rozród

Przewodniczący: Prof. dr hab. Luiza Dusza

Prof. dr hab. Ewa Gregoraszczyk

14.45 – 15.00 Olga Jabłońska, Joanna Piasecka, Anna Nynca,

Renata Elżbieta Ciereszko

EKSPRESJA BIAŁKA RECEPTORA AhR W OSI PODWZGÓRZE-PRZYSADKA-JAJNIK U ŚWINI

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) protein expression in the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in pigs

- 15.00 – 15.15 Janina Skipor, Jarosław Młynarczuk, Adam Grochowalski,
Laurencje Dufourny, Jean-Cloude Thiery
**WPLYW NISKICH DAWEK PCB 153 NA STEZENIE
HORMONÓW TARCZYCY W PLYNIE MÓZGOWO-
RDZENIOWYM U OWIEC**
Effect of exposure to low doses of PCB 153 on thyroid hormones in
the cerebrospinal fluid in ewes
- 15.15 – 15.30 Marcin W. Lis, Andrzej Sechman, Danuta Wątor,
Karolina Głodek, Jerzy W. Niedziółka
**WPLYW PODANIA MIESZANINY PCB *IN OVO* NA
WYLEGOWOŚĆ I STEZENIE HORMONÓW TARCZYCY
WE KRWI JEDNODONIOWYCH PISKLAT**
Effect of *in ovo* injection of PCB mixture on hatchability and
thyroid hormones concentration in blond of one-day-old chicks
- 15.30 – 15.45 Anna Ptak, Jerzy Falandysz, Ewa Ł. Gregoraszczyk
**AKUMULACJA HCB I PECB W ŚCIANIE PEČHERZYKA
JAJNIKOWEGO NA SKUTEK POWTARZALNEGO
NARAŻENIA. PORÓWNANIE DZIAŁANIA HCB I PECB
NA SEKRECJE ESTARDIOLU**
Accumulation of HCB and PeCB in ovarian follicular wall follows
repeated exposure. Comparison of the action HCB and PECB on
estradiol secretion
- 15.45 – 16.00 Michał H. Wróbel, Jarosław Młynarczuk, Jan Kotwica
**SEKRECJA PROSTAGLANDYN Z KOMÓREK
NABŁONKA JAJOWODU KROWY, POD WPLYWEM
POLICHLOROWANYCH BIFENYLI I ICH
HYDROKSYLOWANYCH METABOLITÓW**
The secretion of prostaglandins from epithelial cells of bovine
oviduct, under influence of polychlorinated biphenyls and their
hydroxylated metabolites
- 16.00 – 16.15 Barbara Kamińska, Marek Opalka, Luiza Dusza
**MECHANIZM DZIAŁANIA GENISTEINY I DAIDZEINY W
KOMÓRKACH KORY NADNERCZY ŚWINI: UDZIAŁ
RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH I KINAZ
TYROZYNOWYCH W SEKRECJI ANDROSTENDIONU**
Mechanizm działania genisteiny i daidzeiny w komórkach kory
nadnerczy świni: udział receptorów estrogenowych i kinaz
tyrozynowych w sekrecji androstendionu

Sesja 4.

16.15 -17.45 Adaptacje maczyno- płodowe w okresie ciąży

Przewodniczący: Dr hab. Anna Chełmońska-Soyta

Prof. dr hab. Dariusz Skarżyński

- 16.15 – 16.30 Agata Zmijewska, Anita Franczak, Beata Kurowicka,
Bartosz Wojciechowicz, Genowefa Kotwica
**WPLYW IL-1 β , TNF α I IL-6 NA SYNTEZĘ I SEKRECJĘ
PGE₂ PRZEZ CIAŁKA ŻÓLTE CIĘŻARNYCH ŚWIŃ**
The influence of IL-1 β , TNF α and IL-6 on PGE₂ synthesis and
secretion by corpora lutea of pregnant pigs
- 16.30 – 16.45 Ilona Kowalczyk-Zieba, Katarzyna Jankowska,
Dariusz Jan Skarzynski, Izabela Woclawek-Potocka
**EKSPRESJA RECEPTOROW DLA KWASU
LIZOFOSFATYDOWEGO (LPARS) W BYDŁĘCYM
CIAŁKU ŻÓŁTYM PODCZAS CYKLU I WCZESNEJ
CIAŻY U KROWY**
Expression of lysophosphatidic acid receptors during early
pregnancy and estrus cycle in the bovine corpus luteum
- 16.45 – 17.00 Katarzyna Kamińska, Marta Wasielak, Marek Bogacki
**ROLA RECEPTORA KWASU LIZOFOSFATYDOWEGO 3
(LPA3) W BŁONIE ŚLUZOWEJ MACICY ŚWIŃ WE
WCZESNYCH ETAPACH CIAŻY**
The role of the lisophosphatidic acid receptor 3 in endometrium
during early stages of pregnancy in porcine endometrium
- 17.00 – 17.15 Dominika Słonina, Magdalena K. Kowalik, Jan Kotwica
**UDZIAŁ KOMPLEKSU BŁONOWEGO RECEPTORA
PROGESTERONU (P4) W POZAGENOMOWYM
MECHANIZMIE WPLYWU P4 NA MIOMETRIUM
KROWY**
Involvement of progesterone (P4) receptor membrane component
in nongenomic mechanism of P4 action in bovine myometrium
- 17.15 – 17.30 Mariusz T. Skowronski, Agnieszka Skowronska
**DYSTRYBUCJA I ZMIANY W ILOŚCI AKWAPORYNY 1, 5
I 9 W MACICY ŚWINI PODCZAS CYKLU RUJOWEGO I
WCZESNEJ CIAŻY**
Distribution and changes in amounts of the aquaporin 1, 5 and 9 in
the pig uterus during the estrous cycle and early pregnancy
- 17.30 – 17.45 Agnieszka Rak-Mardyła, Ewa Łucja Gregoraszczyk
**WPLYW PRZYSADKOWEGO GH I IGF-I NA PROCES
PROLIFERACJI, APOPTOZY ORAZ WYDZIELANIE
HORMONÓW PRZEZ KOMÓRKI ŁOŻYSKA LINII JEG-3**
Effect of pituitary growth hormone and insulin-like growth factor
type-I on proliferation, apoptosis and hormone secretion of the
placental cell line JEG-3
- 17:50 – 18:30 Zebranie Zarządu TBR i Komitetu Biologii Zwierząt PAN**

19.00 Uroczysta kolacja

Piątek, 19 lutego 2010

Sesja 5.

8.30 – 10.30 Andrologia molekularna – aspekty poznawcze i aplikacyjne

Przewodniczący: Prof. dr hab. Barbara Bilińska

Prof. dr hab. Jerzy Strzeżek

- 8.30 – 8.45 Ilona Kopera, Linlin Su, Barbara Bilińska, C. Yan Cheng,
Dolores D. Mruk
CZY ADJUDYNA USZKADZA BARIERĘ KREW-JĄDRO?
Is the blood-testis barrier affected by adjudin?
- 8.45 – 9.00 Monika Frączek, Małgorzata Piasecka, Dariusz Gączarzewicz,
Anna Szumała-Kąkol, Anna Kazienko, Stanisław Lenard,
Maria Laszczyńska, Maciej Kurpisz
**Morphological and molecular study on human ejaculated
spermatozoa infected *in vitro* with selective strains of bacteria**
- 9.00 - 9.15 Marta Olszewska, Ewa Wiland, Nataliya Huleyuk, Maciej Kurpisz
**ANALIZA PRZEBIEGU MEJOZY NA KOMÓRKACH
POCHODZĄCYCH Z EJAKULATU U NOSICIELA
TRANSŁOKACJI CHROMOSOMOWEJ WZAJEMNEJ
T(9;13)(P10;P11) O POTWIERDZONEJ AZOOSPERMII**
- 9.15 – 9.30 Krystyna Pierzchała-Koziec, Joanna Zubel, Ewa Ocioń,
Kazimierz Kosiniak-Kamysz
**SEZONOWE ZMIANY AKTYWNOŚCI ENDOKRYNNEJ W
NASIENIU OGIERÓW**
Endocrine manifestation of seasonal quality of stallion's semen
- 9.30 – 9.45 Anna Hejmej, Ilona Kopera, Małgorzata Kotula-Balak,
Barbara Bilińska
**EKSPRESJA KONEKSYNY 43 W GONADZIE MĘSKIEJ
KNURA Z PRAWIDŁOWĄ I ZABURZONĄ W WYNIKU
EKSPOZYCJI NA FLUTAMID SPERMATOGENEZĄ**
Expression of connexin 43 in the pig testes during normal
spermatogenic cycle and following maternal and postnatal exposure
to flutamide
- 9.45 – 10.00 Aleksandra Deszczka, Paweł Wysocki, Jerzy Strzeżek
**ANALIZA PROTEOMICZNA EJAKULATÓW KNURA
CHARAKTERYZUJĄCYCH SIĘ ZRÓŻNICOWANĄ
PRZYDATNOŚCIĄ DO KRIOKONSERWACJI**
Variation in freezability of boar ejaculates characterized by
proteomic analysis

10.00 – 10.15 Anna Leska, Jacek Kieżun, Barbara Kamińska, Marek Opałka,
Luiza Dusza

**SEZONOWE ZMIANY W EKSPRESJI GENU I BIAŁKA
RECEPTORA ANDROGENOWEGO W JĄDRACH
SAMCÓW GĘSI DOMOWEJ**

The effect of season on androgen receptor gene and protein
expression in testis of domestic gander

10.15 – 10.30 Joanna Gromadzka-Ostrowska, Michał Oczkowski,
Katarzyna Dziendzikowska, Marcin Kruszewski, Maria Dusińska,
Gunnar Brunborg

**CZY NANOCZĄSTKI SREBRA MOGĄ ZMIENIĆ
SEKRECJĘ STEROIDÓW PŁCIOWYCH U SZCZURÓW?**

Can silver nanoparticles influence sex steroid hormones plasma
concentration in rats?

10.30 – 10.45 Przerwa na kawę

10.45 – 11.30 Sesja plakatowa II (grupy tematyczne 5 i 6)

Przewodniczący: Prof. dr hab. Jan Kotwica

Prof. dr hab. Jan Udała

Sesja 6.

**11.30 – 13.30 Lokalne regulacje funkcji jajnika u ssaków i niższych
kręgowców**

Przewodniczący: Prof. dr hab. Jadwiga Przała

Prof. dr hab. Janusz Rząsa

11.30 – 11.45 Anna Nitkiewicz, Nina Smolińska, Jadwiga Przała,
Tadeusz Kamiński

**KONCENTRACJA BIAŁKA RECEPTORA OREKSYN
TYPU 2 W JAJNIKU ŚWIŃ W CZASIE CYKLU
RUJOWEGO**

Orexin type 2 receptor protein expression in the porcine ovary
during the oestrous cycle

11.45 – 12.00 Magdalena K. Kowalik, Dominika Słonina, Jan Kotwica

**EKSPRESJA mRNA I IMMUNOLOKALIZACJA
BŁONOWEGO RECEPTORA PROGESTERONU (PGRMC1)
ORAZ BIAŁKA SERBP1 W CIAŁKU ŻÓŁTYM (CL)
KROWY W CZASIE CYKLU RUJOWEGO**

mRNA expression and protein immunolocalization for membrane
progesterone receptor (PGRMC1) and SERBP1 protein in corpus
luteum during estrous cycle in cow

12.00 – 12.15 Barbara Wąsowska, Stanisława Stefańczyk-Krzymowska

**WPLYW INFUZJI TESTOSTERONU DO TĘTNICY
JAJNIKOWEJ WE WCZESNEJ FAZIE PEČHERZYKOWEJ**

U ŚWINI NA WYDZIELANIE HORMONÓW STEROIDOWYCH

The effect of testosterone infusion into the porcine ovarian artery during the early follicular phase on steroid hormones secretion

- 12.15 – 12.30 Katarzyna Pawłowska, Andrzej Sechman
**WPLYW JODOTYRONIN NA EKSPRESJĘ GENÓW
KODUJĄCYCH BIAŁKO StAR I ENZYMY PROCESU
STEROIDOGENEZY W BIAŁYCH PĘCHERZYKACH
JAJNIKOWYCH KURY**
Effect of iodothyronines on StAR protein and steroidogenic enzyme genes expression in chicken white ovarian follicles
- 12.30 – 12.45 Agnieszka K. Grzegorzewska, Anna Hrabia, Janusz Rząsa
**KOMÓRKI PROLIFERUJĄCE I MARKERY APOPTOZY
W JAJNIKU EMBRIONÓW KURZYCH**
Proliferating cells and markers of apoptosis in the ovary of chicken embryo
- 12.45 – 13.00 Tomasz Schwarz, Maciej Murawski, Edward Wierzchoś
**FOLIKULARNA FUNKCJA JAJNIKÓW KÓZ PODCZAS
STYMULACJI AKTYWNOŚCI PŁCIOWEJ W ANESTRUS**
Ovarian follicular function during stimulation of sexual activity in anoestrus goats
- 13.00 – 13.15 Małgorzata Durlaj, Katarzyna Knapczyk-Stwora, Ilona Kopera, Marek Koziorowski, Barbara Bilińska, Maria Słomczyńska
**WPLYW FLUTAMIDU NA EKSPRESJĘ KONEKSYNY 43
W JAJNIKU DOJRZAŁEJ PŁCIOWO ŚWINI**
Connexin 43 gap junction mRNA and protein expression in the ovary of mature pig after exposure to flutamide
- 13.15 – 13.30 Karolina Głodek, Marcin W. Lis, Andrzej Sechman, Barbara Płytycz, Agnieszka I. Mazur, Jerzy W. Niedziółka
**WPLYW PODANIA RYBOFLAWINY *IN OVO* NA ROZWÓJ
EMBRIONALNY I STĘŻENIE HORMONÓW TARCZYCY
WE KRWI, SERCU I WĄTROBIE ZARODKA KURY**
Effect of *in ovo* injection of riboflavin on embryonic development and concentration of thyroid hormones in blood, the heart and the liver of the chick embryo

13.30 – 15.00 Obiad

15.15 Zakończenie konferencji i podsumowanie obrad

Autorzy pozostałych streszczeń proszeni są o przygotowanie posterów (60 cm x 80 cm)

Referat plenarny

MODEL TRANSGENICZNEJ MYSZY DO BADAŃ OWULACJI, IMPLANTACJI ZARODKÓW I BIOLOGII NOWOTWORÓW

A transgenic murine model to study ovulation, implantation and tumor biology

Nafis Rahman

Department of Physiology, University of Turku, Turku, Finland; Departments of Cell Biology, Molecular and Human Genetics, Obstetrics and Gynecology, Florida International University College of Medicine, Miami, FL, USA [E-mail: nafis.rahman@utu.fi; nafis.rahman@fiu.edu]

The versatile transgenic (TG) techniques allow the production of *in vivo* animal models for a variety of diseases, including malignant tumors, through tissue-specific expression of oncogenes. We have created a TG mouse model for gonadal somatic cell tumors by expressing the powerful viral oncogene, Simian virus 40 T-antigen (Tag) under regulation of the murine inhibin α -subunit promoter (inh α /Tag) in two different genetic backgrounds, C57Bl/6J (IT6-F) and DBA (IT6-M). Ovarian granulosa and theca cell tumors were formed in the female, and those of testicular Leydig cells, in the male TG mice at the age of 5–6 months, with 100% penetrance. The tumors produced high levels of inhibin peptides, especially the α -subunit, and were steroidogenically active, mainly producing progesterone. The gonadal tumorigenesis was gonadotropin-dependent and provides a good model for endocrinologically active hormone-dependent tumors. We also investigated tumorigenesis-related fertility aspects (ovulation and implantation) of these two mouse lines. The ontogeny and progression of tumors could be monitored in both inh α /Tag lines by alterations of ovarian weights and serum hormone levels. We also used inh α /Tag model to test different treatment strategies for ovarian tumors, such as gene therapy, destruction of LHR possessing tumor cells *in vivo* by a lytic peptide hecate CGb conjugate or by immunotherapy. Besides studies of formation, regulation and therapy of the tumors *in vivo*, immortalized cell lines derived from them provide models for studies of gonadal somatic cell functions *in vitro*. We studied the role of transcription factors SF-1, DAX-1 and GATA-4 in expression of FSHR in NT-1 murine granulosa cells, immortalized from inh α /Tag mice *in vitro*. We were able to show that SF-1, DAX-1 and GATA-4 are individually but differentially involved in the regulation of FSHR expression, and the nature of the effects varies according the cell lineage, and its developmental and physiological status.

Sesja 1

Od oocytu do zarodka – biotechnologia w rozrodzie zwierząt

Przewodniczący:

Dr hab. Dorota Cieślak, prof. UP

Prof. dr hab. Zdzisław Smorąg

ZDOLNOŚĆ ROZWOJOWA OOCYTÓW KLACZY PO AKTYWACJI PARTENOGENETYCZNEJ

Marta Barańska, Joanna Kochan, Marian Tischner

*Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

W związku ze słabą efektywnością pozaustrojowej produkcji zarodków klaczy opracowanie efektywnych metod produkcji partenogenetycznych zarodków umożliwi stworzenie alternatywnego modelu do badań i poznanie mechanizmów wczesnego rozwoju zarodkowego u koni. Celem przeprowadzonego eksperymentu było porównanie dwóch metod chemicznej aktywacji partenogenetycznej przy użyciu kombinacji jonomycyny z cyklohexamidem lub jonomycyny z 6-dimetyloaminopuryną (6-DMAP).

Do badań wykorzystano 116 jajników uzyskanych od 58 klaczy poddanych ubojowi. Pozyskano 427 oocytów stosując metodę skaryfikacji warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego. Oocyty hodowano *in vitro* przez 30 godzin w uzupełnionej pożywce hodowlanej TCM 199. Następnie oczyszczano oocyty używając hialuronidazę i pipetowanie oraz poddano je ocenie pod mikroskopem stereoskopowym. Oocyty z wyrzuconym pierwszym ciałkiem kierunkowym użyto do aktywacji partenogenetycznej (202 oocyty). W pierwszym etapie zastosowano inkubację wszystkich oocytów w 10 μ M roztworze jonomycyny przez 5 minut, a następnie podzielono oocyty na dwie grupy. Pierwsza grupa (97 oocytów) została poddana inkubacji przez 3 godziny w roztworze 1,9 mM 6-DMAP. Grupę drugą (105 oocytów) poddano inkubacji przez 24 godziny w 10 μ g cyklohexamidu. Po określonym dla każdej z grup czasie aktywacji partenogenetycznej oocyty hodowano *in vitro* w uzupełnionej pożywce DMEM12 przez 36 godzin. Zdolność rozwojową oocytów klaczy po aktywacji oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym poprzez sprawdzenie stanu chromatyny i obecności przedjądrzy.

Zastosowanie jonomycyny z cyklohexamidem lub z 6-DMAP do aktywacji wywołało partenogenezę w oocytach klaczy. Kombinacja jonomycyna wraz z 6-DMAP dała lepsze rezultaty. Pozwoliła na aktywowanie 70 oocytów (72%), natomiast aktywacja z cyklohexamidem pozwoliła na aktywowanie 44 oocytów (36%). Aktywacja przy użyciu jonomycyny i 6-DMAP pozwoliła na rozwój zarodków do stadium 2- (16 oocytów), a nawet 4-blastomerowego (8 oocytów) czego nie stwierdzono po aktywacji jonomycyną i cyklohexamidem.

WPLYW HODOWLI *IN VITRO* I KRIOKONSERWACJI NA FRAGMENTACJĘ JĄDROWEGO DNA PRZEDIMPLANTACYJNYCH ZARODKÓW ŚWINI

M.Bryła, M.Trzcińska, J.Wieczorek, B. Gajda, Z. Smorąg

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki-PIB,32-083
Balice/Kraków, E-mail: mbryla@izoo.krakow.pl*

Celem badań było określenie stopnia zaawansowania zmian apoptotycznych w zarodkach świni w stadium blastocysty uzyskanych *in vivo*, hodowanych *in vitro* i kriokonserwowanych. Zmiany te były oceniane na podstawie charakterystycznej dla procesu apoptozy fragmentacji jądrowego DNA przy zastosowaniu metody TUNEL. Podjęto też próbę określenia zależności pomiędzy fragmentacją jądrowego DNA a jakością zarodków świni hodowanych *in vitro*, wityfikowanych metodą OPS .

Ocena przy użyciu metody TUNEL obejmowała zarodki w stadium ekspandującej blastocysty, zarodki uzyskane w stadium 2- 4- komórkowym poddawane następnie hodowli *in vitro* przez 5-7 dni w pożywce NCSU-23 do stadium ekspandującej blastocysty oraz wityfikowane zarodki w stadium ekspandującej blastocysty uzyskane *in vivo* i *in vitro*.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano ujemną korelację pomiędzy całkowitą liczbą jąder a liczbą jąder apoptotycznych i indeksem apoptotycznym oraz dodatnią korelację pomiędzy liczbą jąder apoptotycznych a wielkością indeksu apoptotycznego. Zaobserwowano statystycznie wysoko istotne różnice ($P \leq 0,001$) w średniej liczbie jąder apoptotycznych i indeksie apoptotycznym pomiędzy grupami zarodków uzyskanych *in vivo*: świeżych oraz wityfikowanych odpowiednio $2,23 \pm 5,46$ i $2,4\%$ oraz $21,8 \pm 24,09$ i $23,5\%$; jak również w grupie hodowanych zarodków: *in vitro* oraz wityfikowanych odpowiednio $12,55 \pm 13,65$ i $20,5\%$ oraz $28,3 \pm 15,78$ i $48,4\%$. Stwierdzono nasilenie fragmentacji DNA w zarodkach hodowanych *in vitro* i kriokonserwowanych w porównaniu z zarodkami świeżymi i wykazano związek między stopniem zaawansowania tych zmian a jakością uzyskanych zarodków.

Wyniki te uprawniają do twierdzenia, iż metoda TUNEL może być wykorzystywana, jako dodatkowe kryterium oceny jakości i zdolności rozwojowych przedimplantacyjnych zarodków świni.

PREGNANCY AFTER TRANSFER OF PIG MATURED OOCYTES VITRIFIED USING OPS METHOD

Gajda B., Smoraż Z.

*Department of Biotechnology of Animal Reproduction, National Research
Institute of Animal Production, 32-083 Balice/Kraków, Poland*

Recently considerable progress have been achieved in the vitrification of porcine embryos, there has been no offspring born from the vitrified oocytes in this species. It was demonstrated that the open pulled straw (OPS) vitrification method has been successfully applied to the cryopreservation of matured bovine oocytes. Moreover the problem of using media with protein for oocytes and embryo cryopreservation has not been definitively resolved. The objective of the experiment was to examine the effect of vitrification solution with or without fetal calf serum (FCS) on in vivo survival of matured pig oocytes vitrified using OPS method. Oocytes matured in vivo at metaphase II derived from superovulated gilts were divided into two groups and vitrified in OPS straw by the method described by Vajta et al. with some modifications in following vitrification solutions: group A.–2.5 M DMSO + 3.2 M ethylene glycol (EG) + 0.6 M sucrose in HEPES/TCM-199 and 20% fetal calf serum (FCS) or group B. – 2.5 M DMSO + 3.2 M EG + 0.6 M sucrose in TCM medium without FCS. The straw were stored in the LN2 for about 2 month. The warming solution was TCM-199 containing various concentration of sucrose. After warming the morphology of oocytes were assessed and oocytes with normal morphology were transfer to synchronized inseminated recipient–gilts. The results demonstrated that the rate of vitrified oocytes having normal morphology was more than 90% in two groups. After transfer of 48 oocytes from group A and 67 from group B into 4 recipients, two gilts which received vitrified oocytes from group A were pregnant. These results indicate that survival in vivo of vitrified pig oocytes depends on the presence or absence of protein in vitrification solution, and the FCS has no positive effect on developmental capacity of vitrified in vivo matured porcine oocytes.

THE LEVEL OF DNA FRAGMENTATION IN MOUSE, RABBIT AND PORCINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO* ANALYZED BY TUNEL METHOD: A PRELIMINARY STUDY

Grad I.¹, Gajda B.¹, Gręda P.²

¹*Department of Biotechnology of Animal Reproduction, National Research Institute of Animal Production, Balice/Kraków*

²*Department of Experimental Embryology, Institute of Genetics and Animal Breeding Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec*

Apoptosis, an active and programmed form of cell death has been observed both *in vitro* and *in vivo* derived preimplantation embryos of many mammalian species and is presumably involved in the elimination of abnormal or redundant cells. Identification of the occurrence of apoptosis in blastocysts can be part of embryo quality assessment protocols. The one of parameters by which apoptosis can be established is DNA fragmentation. The aim of present study was to investigate the DNA fragmentation and cell number in mouse, rabbit, porcine and equine embryos. The experiment was carried out on blastocysts of mouse, rabbit and porcine produced *in vitro*. The DNA fragmentation was analyzed by TUNEL method which base on DNA breaks detected by terminal dUTP labeling. The blastocysts were fixed for 1 h in 4% paraformaldehyde in PBS (Sigma) and washed three times in 50 µl drops of PBS-PVP (1 µg/ml polyvinylpyrrolidone PBS; Sigma). Next the embryos were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS (Sigma) for 40 min at the room temperature and then were incubated in fluorescein-conjugated dUTP and TdT (In Situ Cell Detection Kit, Roche Diagnostics, Germany) for 1 h at 38.5°C and 5% CO₂ in air. The embryos were analyzed under an epifluorescence microscope (Eclipse E600, Nikon) using the following filters: 358-461nm (DAPI) and 520nm (TUNEL). The results are presented in table 1.

Table 1. The average number of cell in blastocyst and level of DNA fragmentation in mouse, rabbit and porcine embryos.

Embryos	No. of blastocysts assessed	Average number of cell/blastocyst	Avarage number of apoptotic nuclei/blastocyst	% TUNEL positive
Mouse	23	31.6	4.7	10.8
Rabbit	13	74.0	5.5	7.5
Porcine	34	28.5	3.2	11.3

Our observations demonstrated that total cell number in mouse and porcine blastocyst produced *in vitro* varied between 28.5 and 74 cell per blastocyst, whereas number of nuclei with fragmented DNA in embryos produced *in vitro* of this species range from about 3 to 5.

CECHY MORFOMETRYCZNE PLEMNIKÓW KNURÓW RASY DUROC W ZALEŻNOŚCI OD KONCENTRACJI PLEMNIKÓW W EJAKULACIE

Stanisław Kondracki, Anna Wysokińska, Dorota Banaszewska, Dorota Sitarz

*Akademia Podlaska, Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt,
ul. B. Prusa 14, 08-110 Siedlce*

Podjęto próbę oceny wpływu koncentracji plemników w ejakulacie na wymiary, kształt i częstość występowania anomalii morfologicznych plemników oraz cechy fizyczne ejakulatu knurów rasy Duroc.

Badaniami objęto 75 ejakulatów pobranych od 8 knurów rasy Duroc. Od każdego knura raz w miesiącu pobierano ejakulat, z którego sporządzano preparaty mikroskopowe do badań morfologii plemników. W każdym preparacie wykonano pomiary morfometryczne piętnastu losowo wybranych plemników według metodyki opracowanej przez Kondrackiego i in. (2005)*. Obliczono też wskaźniki budowy morfologicznej plemników i przeprowadzono ocenę częstości występowania zmian morfologicznych wyszczególniając plemniki wykazujące zmiany główne i podrzędne zgodnie z klasyfikacją Bloma. Przeprowadzono również standardową ocenę badanych ejakulatów według metod stosowanych w polskich stacjach unasienniania loch. Zebrany materiał podzielono na podgrupy według kryterium koncentracji plemników w ejakulacie wyodrębniając: ejakulatory o koncentracji plemników mniejszej niż 500 tys./mm³ (grupa I), ejakulatory o koncentracji plemników 500 - 600 tys./mm³ (grupa II) i ejakulatory o koncentracji plemników większej niż 600 tys./mm³ (grupa III).

Wykazano zależność wymiarów plemnika od koncentracji plemników w ejakulacie. W ejakulatach o koncentracji plemników powyżej 600 tys./mm³ (grupa III) plemniki miały mniejsze wymiary niż plemniki z ejakulatów o mniejszej ich koncentracji. Były to plemniki o główkach krótszych o 0,21 μm niż plemniki z ejakulatów o mniejszej koncentracji plemników (P≤0,01). Ponadto plemniki z ejakulatów o największej koncentracji (grupa III) miały istotnie węższe główki (P≤0,05), krótsze witki oraz mniejszy obwód i pole powierzchni główki niż plemniki z ejakulatów o mniejszej ich koncentracji. W grupie ejakulatów o koncentracji plemników powyżej 600 tys./mm³ wykazano najmniejszy udział plemników ze zmianami głównymi, natomiast stwierdzono najwięcej plemników ze zmianami podrzędnymi. W grupie ejakulatów o koncentracji plemników od 500 do 600 tys./mm³ (grupa II) stwierdzono największą objętość ejakulatu. Z tych ejakulatów przygotowywano najwięcej dawek inseminacyjnych (około 27 dawek z jednego ejakulatu). Z jednego ejakulatu grupy II sporządzono o ponad 6 dawek inseminacyjnych więcej niż z ejakulatu o koncentracji plemników mniejszej niż 500 tys./mm³ (P≤0,01).

*Kondracki S., Banaszewska D., Mielnicka C. 2005, *The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pig (Sus scrofa domestica)*. Cell. Mol. Biol. Lett. Vol. 10, No 1, 3-13.

ANALIZA PORÓWNAWCZA MORFOLOGII PLEMNIKÓW KNURÓW RASY DUROC I PIETRAIN

Stanisław Kondracki, Anna Wysokińska, Maria Iwanina, Małgorzata Huszno

*Akademia Podlaska, Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt,
ul. B. Prusa 14, 08-110 Siedlce*

Podjęto próbę porównania cech budowy morfologicznej plemników w ejakulatach knurów ras Duroc i Pietrain.

Materiał doświadczalny stanowiło 116 ejakulatów pobranych od 6 knurów rasy Duroc i od 9 knurów rasy Pietrain. Do badań wybrano knury młode rozpoczynające użytkowanie rozplodowe. Ocenie poddano ejakulatory pobierane od każdego knura w odstępach jednego miesiąca przez okres około 10 miesięcy. Z każdego ejakulatu bezpośrednio po pobraniu przygotowano preparat do badań mikroskopowych. W każdym preparacie przeprowadzono ocenę częstości występowania zmian morfologicznych wyszczególniając plemniki wykazujące zmiany główne i podrzędne zgodnie z klasyfikacją Bloma oraz wykonano pomiary morfometryczne piętnastu losowo wybranych plemników o prawidłowej budowie morfologicznej według metodyki opracowanej przez Kondrackiego i in. (2005)*. Na podstawie wyników pomiarów morfometrycznych obliczono wskaźniki budowy morfologicznej plemników. Przeprowadzono również standardową ocenę badanych ejakulatów według metod stosowanych w polskich stacjach unasienniania loch.

Wykazano, że ejakulatory knurów obydwu badanych ras charakteryzują się dobrą jakością. Udział plemników o prawidłowej budowie morfologicznej w nasieniu knurów ras Duroc i Pietrain był duży i wynosił około 94 %. Stwierdzono różnice w wymiarach plemników knurów badanych ras. W ejakulatach knurów rasy Pietrain stwierdzono krótsze i węższe główki plemników niż w ejakulatach knurów rasy Duroc. Plemniki knurów rasy Pietrain miały o $0,8\mu\text{m}$ dłuższe witki niż plemniki knurów rasy Duroc ($P\leq 0,01$) i o $0,5\mu\text{m}$ większą łączną długość plemnika niż knury Duroc ($P\leq 0,05$). Ponadto plemniki knurów rasy Pietrain charakteryzowały się mniejszym obwodem główki niż plemniki knurów Duroc ($P\leq 0,01$). Ejakulatory rozplodników rasy Duroc miały mniejszą objętość o ponad 90 ml niż knury rasy Pietrain, ale o ponad 100 tys./mm³ większą koncentrację plemników ($P\leq 0,01$). W ejakulatach pobieranych od knurów rasy Pietrain stwierdzono o około 10 mld więcej plemników niż w ejakulatach knurów rasy Duroc ($P\leq 0,01$). Z jednego ejakulatu knurów rasy Pietrain można było uzyskać o ponad 6 dawek inseminacyjnych więcej niż z jednego ejakulatu rozplodników Duroc ($P\leq 0,01$).

*Kondracki S., Banaszewska D., Mielnicka C. 2005, *The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pig (Sus scrofa domestica)*. Cell. Mol. Biol. Lett. Vol. 10, No 1, 3-13.

THE USE OF CALCIUM IONOMYCIN AND CYCLOHEXIMIDE/6-DIMETHYLAMINOPURINE COMBINATION FOR ACTIVATION OF NUCLEAR-TRANSFERRED RABBIT OOCYTES

Yuriy Kosenyuk, Maria Skrzyszowska

*Department of Biotechnology of Animal Reproduction,
National Research Institute of Animal Production,
32-083 Balice/Kraków, Poland*

The aim of the present study was to determine the effect of chemical activation with ionomycin and combination of cycloheximide (CHXM) and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) on developmental potential of cloned rabbit embryos reconstructed with adult skin fibroblast cell nuclei.

In the somatic cell nuclear transfer (SCNT) procedure, in vivo-matured oocytes were used as source of recipient cells. Mature New Zealand female rabbits were superovulated by injection of 100 IU of PMSG (Serogonadotropin, Biowet) then after 72 h injected intravenously with 100 IU of hCG (Biogonadyl, Biomed) to induce ovulation. Ovulated oocytes were recovered from the oviducts 17-18 h after hCG injection by flushing with Dulbecco's PBS. Enucleation of Metaphase II-stage oocytes was accomplished by demecolcine-induced microsurgical method. The source of nuclear donor cells were adult skin fibroblasts. A single somatic cell was introduced into the perivitelline space of the enucleated oocyte and membrane fusion of the donor cell and recipient oocyte was induced by 3 DC pulses of 3.2 kV/cm for 20 μ s each. The reconstructed oocytes were incubated in B2 medium for 1 h and subsequently treated with 5 μ M calcium ionomycin for 5 min to be artificially activated. Then, nuclear-transferred oocytes were incubated in B2 medium supplemented with 10 μ g/mL CHXM and 2 mM 6-DMAP for 1 h. The cloned embryos were cultured in vitro in 50 μ l droplets of B2 medium for 5 to 6 days.

Developmental abilities of nuclear-transferred rabbit embryos were assessed by cleavage rate and morula/blastocyst formation yields. Out of 99 reconstructed oocytes, 68 (68.7%) SCNT embryos were cleaved. The frequencies of cloned embryos that reached the morula and blastocyst stages were 65/99 (65.7%) and 29/99 (29.3%), respectively.

In conclusion, the competences of nuclear-transferred rabbit embryos to develop in vitro to morula and blastocyst stages were relatively high following combined chemical activation.

WPŁYW TETRACHLORODIBENZODIOKSYNY (TCDD) NA ROZWÓJ IN VITRO OOCYTÓW KLACZY I KROWY

Agnieszka Nowak, Joanna Kochan, Krzysztof Czachura, Adam Okólski

Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Jednym z największych zagrożeń dwudziestego wieku jest postępujące zanieczyszczenie środowiska. Niekontrolowane procesy spalania powodują, że do środowiska uwalniane zostają jedne z najbardziej toksycznych związków chemicznych - dioksyny. Odnotowuje się coraz więcej doniesień odnośnie szkodliwości dioksyn na układy: endokryny, rozrodczy, nerwowy, immunologiczny.

Celem pracy było określenie wpływu dioksyn na rozwój oocytów klaczy i krowy w warunkach *in vitro*. Do badań wykorzystano 293 oocyty klaczy oraz 340 oocytów krowy, pozyskane z jajników po uboju zwierząt. Oocyty hodowano *in vitro* (IVM), dodając do pożywki TCDD w stężeniach: 0, 32 µg/ml (gr.1); 3,2 µg/ml (gr.2); 32 µg/ml (gr.3). Grupę kontrolną (gr.0) stanowiły oocyty hodowane w pożywce bez dodatku TCDD. Po hodowli *in vitro* oocyty wybarwiano orceiną lub barwnikiem fluorescencyjnym hoechst i oceniano biorąc pod uwagę 4 następujące stadia: oocyty w metafazie II z I ciałkiem kierunkowym (met II), w metafazie I (met I), w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV) oraz zdegenerowane (Zdg).

Po hodowli *in vitro* przy największym stężeniu dioksyn (32 µg/ml) nie stwierdzono oocytów klaczy dojrzałych do stadium metafazy II. W grupie tej odnotowano najwięcej oocytów zdegenerowanych (92,9%). Natomiast w przypadku oocytów krowy 3,13 % oocytów osiągnęło dojrzałość (Met II), a oznaki degeneracji wystąpiły u 82,7% oocytów. Degeneracja w przypadku obu gatunków przejawiała się fragmentacją cytoplazmy i pękaniem osłonki przejrzystej.

Najwięcej oocytów dojrzałych stwierdzono w grupie kontrolnej, bez dodatku dioksyn odpowiednio 47,14% w przypadku klaczy i 80% w przypadku oocytów krowy. Najniższe stężenie TCDD w pożywce IVM (0,32 µg/ml) przyczyniło się do obniżenia ilości oocytów dojrzałych. Wśród oocytów klaczy 28,38% osiągnęło stadium metafazy II, w przypadku bydła 29,33%.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że TCDD wpływa niekorzystnie na dojrzewanie oocytów końskich i bydłych w warunkach *in vitro*.

**DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF BOVINE OOCYTES
CULTURED WITH HIALURONIAN AND QUALITY OF OBTAINED
BLASTOCYSTS ASSESSED BY TUNEL – PRELIMINARY RESULTS**

Opiela J., Ryńska B., Smoraż Z.

*Department of Biotechnology of Animal Reproduction, National Research
Institute of Animal Production, 32-083 Balice, Poland*

The aim of the experiment was to determine the affect of hialuronian (HA) added to maturation medium (IVM) on oocytes' developmental competence and to assess the quality of obtained blastocysts on the basis of DNA fragmentation. Bovine blastocysts were produced following IVM of immature oocytes in 3 culture Groups: Group 1-supplemented with 25 µl of 10% HA per ml IVM; Group 2-supplemented with 12,5 µl of 10% HA per ml IVM and Group 3-control without HA.

Embryo culture to the blastocyst stage was carried out in the co-culture with Vero cells, in B2 medium, at humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

A total number of 40 blastocysts (13 HA and 27 Control) was used for assessment of DNA fragmentation by TUNEL assay (DeadEndTM Fluorometric TUNEL System, Promega).

Culture medium	Oocytes taken to IVF	Cleavage n (%)	Total blastocyst n (%)	Hatched blastocysts n (%)	Total no of nuclei / n blacosysts
Group 1 25 µl of 10% HA/ ml	72	63 (87,5%)	8 (12,7%) ^a	2 (25%)	545/5 ^{A, a}
Group 2 12.5 µl of 10% HA/ ml	108	84 (77,8%) ^A	10 (11,9%) ^A	(-%)	452/8 ^B
Group 3 Control	167	152 (91%) ^B	40 (26,3%) ^{b, B}	15 (37,5%)	2205/27 ^b

Values with the same letters in the row do not differ statistically. Values with different letters within the same column differ statistically (A:B, P<0.01; a:b, P<0.05; test χ^2).

Developmental competence of Group 2 oocytes was significantly statistically lower comparing to control as for cleavage and total blastocysts rate P<0.01. Also developmental competence of Group 1 oocytes turned to be lower comparing to control in regard to blastocysts rate P<0.05 (χ^2 test).

Although blastocysts from all Groups contained apoptotic cells (G1-17%, G2-26,3%, G3-17%) as measured by Death Cell Index (DCI) there was no statistical difference between them. However, we observed statistical difference between total number of nuclei of blastocysts developed: between Group 1 and Group 2 (P<0.01) and between Group 1 and 3 (P<0.05) (Duncan Multiple Range Test).

In conclusion, the supplementation of oocytes IVM with low concentration of hialuronian does not improve their developmental competence, but lower blastocysts rates in HA Groups are not connected with detrimental effect of HA on DNA fragmentation. Moreover, the statistically higher number of total nuclei

in blastocysts developed in Group 1 seems to be an interesting result calling for more extensive research. Interestingly, the results of cleavage and blastocysts rates of Group 1 are superior to Group 2 therefore we plan to test higher concentrations of HA as IVM supplement.

CZAS PIERWSZEGO PODZIAŁU ZYGOTY WPŁYWA NA CZĘSTOŚĆ ZABURZEŃ CHROMOSOMOWYCH W ZARODKACH BYDŁA POZYSKANYCH IN VITRO

E. Pers-Kamczyc, P. Pawlak, N. Reńska, D. Lechniak

*Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli
Zwierząt, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań*

Zarodki pozyskane w warunkach *in vitro* charakteryzują się wyższym udziałem zaburzeń chromosomowych w porównaniu do zarodków pozyskanych *in vivo*, co ma m.in. związek z sub-optymalnymi warunkami inkubacji. Wykazano, iż zygoty bydła podejmujące pierwszy podział bruzdkowania do 30h po inseminacji (hpi) częściej osiągają stadium blastocysty. **Celem niniejszej pracy** była analiza związku pomiędzy czasem zajścia pierwszego podziału zygoty a częstością zaburzeń chromosomowych w zarodkach bydła 4 dnia pi. **Oocyty** poddawano 24h dojrzewaniu w podłożu TCM-199 (pirogonian sodu, fafBSA, FSH, GH), inseminacji, a następnie inkubacji w pożywkach G1.3/G2.3. Zarodki, które 30hpi osiągnęły stadium ≥ 2 -bl (*early cleavers* EC) przenoszono do świeżej pożywki i inkubowano jako grupę EC. Pozostałe zarodki, które 48hpi osiągnęły stadium ≥ 2 -bl (*non-early cleavers* NEC) inkubowano jako grupę NEC. Czwartego dnia pi zarodki podzielono na 2 grupy: < 8 -bl oraz ≥ 8 bl i utrwalano w celu poddania analizie cytogenetycznej metodą FISH (*Rybar i wsp. Zygoty 2005*). W procedurze hybrydyzacji użyto sond specyficznych dla chromosomów bydła par 6 i X. Ocenę obrazów mikroskopowych oparto o klasyfikację Viuff i wsp. (*Biol Reprod 2000*). Wszystkie blastomery zarodków prawidłowych posiadały diploidalną liczbę chromosomów (płeć męska: $2x6$ i $1xX$; płeć żeńska $2x6$ i $2xX$). Zarodki mozaikowe posiadały min. 2 blastomery o nieprawidłowej liczbie chromosomów, natomiast poliploidalne charakteryzowały się obecnością zwielokrotnionej, haploidalnej liczby chromosomów we wszystkich blastomerach. **Dotychczas przeanalizowano 141** zarodków (EC - 66, NEC - 75). Ze względu na obecność cytoplazmy oraz nieprawidłowe rozproszenie blastomerów, 22% utrwalonych zarodków było nieprzydatnych do analizy. W analizowanej populacji 4 dniowych zarodków bydła stwierdzono: zarodki prawidłowe (56,7%), mozaikowe (43,3%) i brak zarodków poliploidalnych. Więcej zarodków EC posiadało > 8 bl (78,8%), w porównaniu z grupą NEC (62,7%). Stąd udział zarodków opóźnionych w rozwoju (≤ 8 -bl) był istotnie wyższy w grupie NEC (37,3%, 28/75) niż EC (21,2%, 14/66). **Podsumowując**, czas zajścia pierwszego podziału zygoty wpływa na częstość występowania zaburzeń chromosomowych w zarodkach bydła. Zarodki EC charakteryzują się wyższym potencjałem rozwojowym i niższym udziałem zaburzeń chromosomowych.

Badania wykonane w ramach grantu MNiSW nr N302 04631/3780

**CREATION OF PORCINE CLONED EMBRYOS USING
PSEUDOPHYSIOLOGICAL TRANSCYTOPLASMIC ACTIVATION OF
OOCYTES RECEIVING NUCLEOFECTED ADULT SKIN-DERIVED
FIBROBLAST CELL NUCLEI**

Marcin Samiec¹, Maria Skrzyszowska¹, Daniel Lipiński^{2,3}, Ryszard Słomki^{2,3}

¹*Department of Biotechnology of Animal Reproduction, National Research Institute of Animal Production, 32-083 Balice n. Kraków, Poland;* ²*Department of Biochemistry and Biotechnology, Agricultural University, 60-637 Poznań, Poland;* ³*Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, 60-479 Poznań, Poland*

We have recently developed a novel method of pseudophysiological transcomplementary (transcytoplasmic) activation to stimulate the developmental program of porcine oocytes reconstructed by somatic cell nuclear transfer (SCNT). The mechanism underlying this original technique of activation is transcytoplasmic influx of sperm-derived proteins triggering intracellular calcium oscillations, which is mediated via heterologous (rabbit) zygote-descended cytoplasts. The aim of our study was to determine the *in vitro* developmental capability of porcine cloned embryos following pseudophysiological activation of nuclear-transferred (NT) oocytes reconstituted with *Tg(pWAPhGH-GFPBsd)* gene construct-nucleofected boar ear cutaneous fibroblast cells. In the cloning procedure, *in vitro*-matured gilt or sow oocytes were used as recipient cells for cell nuclei of positively selected transgenic somatic cells. The reconstruction of enucleated oocytes was performed by intracytoplasmic injection of either the fibroblast cell-derived karyoplast or whole tiny nuclear donor cell. The activation of NT oocytes was achieved by fusion of them with the cytoplasts isolated from *in vivo*-derived rabbit zygotes (i.e., with the so-called zygoplasts), which was induced by application of two successive DC pulses of 1.2 kV cm^{-1} for 60 μsec . Cloned embryos were cultured *in vitro* in NCSU-23/BSA/FBS medium for 6 to 7 days up to morula and blastocyst stages. A total of 174/196 (88.8%) oocytes receiving nucleofected fibroblast cell nuclei were successfully electrofused with zygoplasts. Out of 174 cultured SCNT-derived embryos, 111 (63.8%) were cleaved. The rates of transgenic cloned embryos that reached the morula and blastocyst stages yielded 78/174 (44.8%) and 39/174 (22.4%), respectively. In conclusion, the novel method of pseudophysiological transcytoplasmic activation of porcine NT oocytes seems to be reliable and feasible for efficient stimulation of preimplantation development of clonal cybrids. Moreover, the relatively high frequencies of transgenic morulae and blastocysts were noticed among *in vitro* cultured cloned pig embryos produced by this strategy of activation of oocytes reconstructed with *Tg(pWAPhGH-GFPBsd)* fusion gene-nucleofected adult dermal fibroblast cell nuclei.

**DEVELOPMENTAL OUTCOME OF CLONED GOAT EMBRYOS
FOLLOWING CHEMICAL ACTIVATION OF NUCLEAR-
TRANSFERRED OOCYTES ORIGINATING FROM ADULT
CUTANEOUS FIBROBLAST CELLS**

Maria Skrzyszowska, Marcin Samiec

*Department of Biotechnology of Animal Reproduction, National Research
Institute of Animal Production, 32-083 Balice n. Kraków, Poland*

The purpose of our study was to determine the developmental potential of caprine nuclear transfer-derived embryos reconstituted with adult dermal fibroblast cells. Fibroblast cells were *in vitro* cultured up to a total confluency state and then used for the somatic cell nuclear transfer (SCNT) as a source of nuclear donor cells. Enucleated *in vitro*-matured caprine oocytes were the source of recipient cells. Single nuclear donor cells were injected into a perivitelline space of previously enucleated oocytes. Fibroblast cell-ooplast couplets were simultaneously fused and activated with a single DC pulse of 2.4 kV/cm for 15 μ sec. After a 1-h delay, the reconstructed oocytes were additionally activated by exposure to 5 μ M/L calcium ionomycin for 5 min followed by treatment with 2 mM/L 6-dimethylaminopurine for 2 h. The SCNT-derived embryos were *in vitro* cultured in 50- μ L droplets of B2 medium for 24 h. Afterwards, cloned embryos at 2-4-cell stages either were transferred into reproductive tracts of recipient does or were co-cultured with *Vero* cells in B2 medium supplemented with 10% FBS for an additional 120 to 168 h up to morula/blastocyst stages. A total of 125/138 (90.6%) enucleated oocytes were successfully fused with nuclear donor cells and intended to be *in vitro* cultured. Out of 125 cultured SCNT embryos, 81 (64.8%) were cleaved. From among them, 53 2-4 cell-staged embryos were transferred into 6 recipient females. Following 6-8 days of *in vitro* culture, 18/34 (52.9%) and 14/34 (41.2%) cloned embryos reached the morula and blastocyst stage, respectively. Ultrasonographic diagnostics of gestation was performed between Days 35 and 42 after transfer of SCNT embryos into recipient females. The presence of fetuses (with the symptoms of early resorption of amniotic sacs) was confirmed in the 2/6 (33.3%) recipients. In conclusion, it has been shown that the ear skin-derived fibroblast cell nuclei were able to support the preimplantation development of caprine cloned embryos to morula and blastocyst stages. The preimplantation developmental competences of nuclear-transferred embryos to reach the morula and blastocyst stages were relatively high. Moreover, SCNT embryos were unable to implant *in utero* and failed to establish pregnancy.

NOWE KRYTERIA W KOMPLEKSOWEJ METODZIE OCENY NASIENIA KNURA

Barbara Szczęśniak-Fabiańczyk, Michał Bochenek, Piotr Gogol,
Monika Trzcińska, Magdalena Bryła, Zdzisław Smorąg

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki-PIB, Balice

Próby określenia zdolności zapładniającej plemników na podstawie powszechnie stosowanych metod oceny nasienia, czyli ruchliwości i koncentracji, ewentualnie uzupełnionych oceną morfologiczną i testami biochemicznymi, nie są w pełni zadawalające. W związku z tym wciąż są poszukiwane nowe kryteria oceny plemników. Podjęte badania są próbą wykorzystania nowych metod laboratoryjnych, takich jak: cytometryczna ocena stanu chromatyny plemnikowej i integralności błon plemników, ocena uszkodzeń oksydacyjnych, oraz zmian apoptotycznych w plemnikach, dla opracowania bardziej precyzyjnej podstawy do przewidywania płodności nasienia.

Badania wykonano na 21 ejakulatach pochodzących od 3 knurów Pietrain x Duroc (6-9 ejakulatów od knura). Pobrane z rozrzedzonego rozcieńczalnikiem BTS nasienia próbki poddano ocenie z wykorzystaniem standardowych i nowych metod laboratoryjnych, a nasienie wykorzystano do inseminacji loch (232 szt.) w ciągu 3 dni od pobrania.

Średnia płodność loch wynosiła 75,4 % i wahała się od 65,5 % do 80,5 % dla poszczególnych knurów. Wyniki badań przeprowadzonych testów laboratoryjnych potwierdzają dobrą jakość nasienia (81,4 % – 86,2 % plemników bez zmian morfologicznych, 88,7 % – 90,3 % plemników z nieuszkodzoną błoną cytoplazmatyczną ocenioną cytometrycznie, niski odsetek plemników z uszkodzoną chromatyną – 2,4 % – 3,91 %, 18,3 % – 21,5 % plemników ze zmianami apoptotycznymi lub nekrotycznymi oraz niski poziom uszkodzeń oksydacyjnych – wartość parametru integral od 7,41 do 11,09x10⁵). Wyliczone współczynniki korelacji między średnimi wartościami większości badanych cech nasienia a jego płodnością są dość wysokie, lecz jedynie statystycznie istotną (p<0,05) okazała się ujemna korelacja płodności z odsetkiem plemników z uszkodzoną błoną komórkową. Uzyskanie wyników opartych na większej liczbie materiału doświadczalnego może rozstrzygnąć o wnioskowaniu co do przydatności zastosowanych kryteriów oceny nasienia.

WYKRYWANIE I OCENA WPLYWU APOPTOZY NA ZDOLNOŚĆ ZAPŁADNIAJĄCĄ PLEMNIKÓW KNURA

M. Trzcńska, M. Bryła, J. Wieczorek, B. Gajda, B. Szczęśniak-Fabiańczyk,
Z. Smorąg

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki-PIB,
32-083 Balice/Kraków, E-mail: mcala@izoo.krakow.pl*

Celem pracy było opracowanie metod wykrywania zmian apoptotycznych w plemnikach knura oraz zbadanie związku pomiędzy apoptozą w plemnikach a apoptozą w zarodkach. Ocenę apoptozy w plemnikach przeprowadzano w dniu pobrania nasienia i w ciągu trzech pierwszych dni przechowywania w temp. 15-17°C oraz w dniu, kiedy ruchliwość plemników osiągała 30%. Apoptozę w zarodkach uzyskanych w wyniku inseminacji loszek nasieniem świeżym i przechowywanym oceniano na podstawie aktywności kaspazy-3.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń w nasieniu świeżym knurów stwierdzono obecność plemników apoptotycznych identyfikowanych zarówno przy pomocy barwienia z zastosowaniem fluorochromu YO-PRO-1 jak i aneksyny V-FITC. Najniższy odsetek plemników apoptotycznych wynoszący 3,6% stwierdzono w nasieniu świeżym knura nr 1. Nasienie pozostałych knurów zawierało odpowiednio: 6,0; 6,25; 4,0 i 6,1% plemników apoptotycznych. Przechowywanie nasienia przez 24 godziny nie powodowało istotnego wzrostu odsetka plemników apoptotycznych. Istotne różnice w odsetku plemników apoptotycznych zaobserwowano jedynie pomiędzy ejakulatami dwóch knurów w dniu, w którym ruchliwość plemników osiągała 30%. Wraz z upływem czasu przechowywania obserwowano wzrost odsetka plemników nekrotycznych oraz spadek odsetka plemników żywych.

Blastocysty uzyskane od loszek inseminowanych nasieniem przechowywanym wykazywały istotnie wyższy odsetek wysokiej aktywności kaspazy-3 w porównaniu z blastocystami uzyskanymi od loszek inseminowanych nasieniem świeżym. Nie wykazano korelacji pomiędzy odsetkiem plemników apoptotycznych w nasieniu świeżym i przechowywanym użytym do inseminacji, a aktywnością kaspazy-3 w uzyskanych zarodkach.

Reasumując wykrywanie zmian apoptotycznych w plemnikach może stanowić dodatkowe kryterium oceny zdolności zapładniającego nasienia. Wydaje się jednak, że zastosowanie tej metody będzie uzasadnione jedynie w przypadku kiedy standardowe metody oceny nasienia nie wyjaśniają przyczyn jego obniżonej płodności.

CLINICAL ASPECT OF REPEATABLE LAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP (OPU) IN GOAT

J. Wiczorek, Y. Kosenyuk, B. Rynska, M. Cegla

Department of Biotechnology of Animal Reproduction, National Research Institute of Animal Production, Krakowska 1, Balice/Kraków Poland

The aim of the study was to develop new laparoscopic technique for repeated recovery of goat oocytes useful for in vitro culture and in vitro fertilization and cloning. In clinical aspect were taken into consideration damage tissues, adhesions in abdominal cavity, scar formations and disorder in reproductive tract in repeated donors after 2 – 5 operation recovering oocytes.

Oocytes were aspirated with originally designed catheter with needle of 10mm long, thin 21 – 22G, bevel 30°. The catheter allow to recover oocytes without damage ovary and to keep very good quality recovered oocytes. The oocytes donors were 17 goats. Oocytes were collected: one time (I group, n=17), two times (II group, n=17), three times (III group, n=10), four times (IV group, n=8) and 5 time (V group, n=2). Goats were synchronized and superovulated. The endoscope was inserted into the abdominal cavity through umbilicus. Two trockars for putting the manipulators were inserted 15 cm below the udder. Oocytes were collected by aspiration of the follicular fluid from the ovarian follicles. Depending on the size, the single aspiration of up to 8 follicles was performed. The following rules of the evaluation and classification of the oocytes were established: class I – homogenous cytoplasm, at least 3 layers of the granulosa cells, class II – homogenous cytoplasm, 1-2 layers of granulosa cells, class III – homogenous cytoplasm, no granular cells, class IV – heterogenous cytoplasm, independently of the granulosa cells. Oocytes class I, II and III were qualified for the culture.

Group	Number aspirated follicle	Recovered oocytes (%)	Morphology recovered oocytes			
			I class (%)	II class (%)	III class (%)	IV class (not qualified) (%)
I	172	78 (45,0)	39 (50,0)	27 (35,5)	10 (13,2)	2 (2,6)
II	81	45 (55,6)	2 (4,4)	31 (68,9)	9 (21,4)	3 (6,7)
III	64	35 (54,6)	11 (17,2)	13 (37,1)	10 (29,4)	1 (2,9)
IV	84	68 (80,9)	21 (25,0)	39 (57,4)	6 (9,1)	2 (2,9)
V	12	12 (58,3)	0 (0,0)	7 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	413	233 (56,4)	73 (32,4)	117 (52,0)	35 (15,6)	8 (3,5)

In clinical aspect no any complication were detected after first three operations. In IV group in one animal (1/8) was adhesion omentum with peritoneum into place of inserting grasp and in one animal in V group (1/2) was adhesion infundibulum with ovary. No any changes in ovary were observed. The obtained results suggest the proposed technique allows for the collecting oocytes of good quality that can be used for IMV/IVF techniques and cloning. The method can be useful for multiple recovery oocytes in goat.

Sesja 2

Centralna i obwodowa regulacja uwalniania GnRH

Przewodniczący:

Prof. dr hab. Krystyna Koziec

Prof. dr hab. Jolanta Polkowska

**WPLYW FOTOPERIODU NA EKSPRESJĘ KRÓTKIEJ FORMY
RECEPTORA LEPTYNY (ObRa) W SPŁOCIE NACZYNIÓWKOWYM III
KOMORY MÓZGU U SAMICY KRZYŻÓWKI ŚWINI DOMOWEJ I
DZIKA ORAZ U ŚWINI DOMOWEJ**

**The effect of photoperiod on the expression of short form leptin receptor
(ObRa) in the choroid plexus of III ventricle of brain in female of pig and
wild boar crossbred and domestic pig**

Przemysław Gilun¹, Janina Skipor¹, Marek Koziorowski², Stanisława Stefańczyk-Krzymowska¹

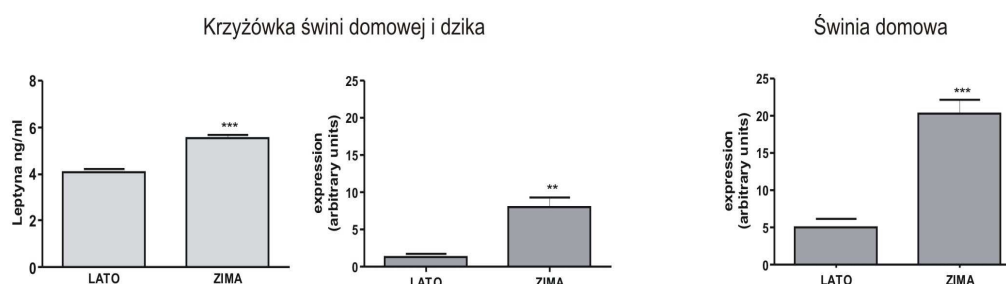
¹*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie,
Tuwima 10, 10-243 Olsztyn,*

²*Uniwersytet Rzeszowski, Zamiejscowy Wydział Biotechnologii, Werynia 502, 36-
100 Kolbuszowa.*

Samice krzyżówki świni domowej i dzika, u których sezonowe zmiany zdolności rozrodczej są bardzo silnie wyrażone, są dobrym modelem do badań sezonowej regulacji procesów rozrodczych u świni domowej.

Leptyna, niezależnie od jej roli jako jednego z regulatorów równowagi energetycznej organizmu, uczestniczy w regulacji wydzielania hormonów gonadotropowych. Można więc przypuszczać, że ma ona wpływ na sezonowe zmiany aktywności rozrodczej samic.

Leptyna dociera do jąder podwzgórza pokonując barierę krew-mózg i barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy. Wykazano silną ekspresję krótkiej formy receptorów leptyny (Ob-Ra) w splocie naczyniówkowym III komory mózgu (*choroid plexus*). Wiadomo jednak, że receptory te nie uczestniczą w biologicznym działaniu leptyny, lecz spełniają rolę w jej transporcie. Celem badań było oznaczenie ekspresji Ob-Ra w splocie naczyniówkowym III komory mózgu u samicy krzyżówki świni domowej i dzika oraz u świni domowej w okresie najdłuższego dnia (czerwiec) i najkrótszego dnia (grudzień).



Podsumowując, jednoczesny wzrost wydzielania leptyny i poziomu ekspresji genu krótkiej formy receptora leptyny (ObRa) w splocie naczyniówkowym sugeruje zwiększenie dostępności leptyny do miejsc docelowych w podwzgórzu oraz przysadce w okresie długiego dnia.

**STRESS EFFECT ON MORPHOMETRIC PARAMETERS OF
FUNCTIONAL ACTIVITY OF RAT PROTOPLASMIC AND FIBROUS
ASTROCYTES ARCUATE AND PREOPTIC NUCLEI AT DIFFERENT
STAGES OF ESTROUS CYCLE**

Mykola Dzerzhynsky, Andriy Pustovalov, Mariia Matviienko,
Volodymyr Senchylo

*Department of Cytology, Hystology and Developmental Biology, Kyiv National
Taras Shevchenko University*

The study has been conducted on 24 female 3-months old rats. Rats have been immobilized for 1,5 hours at estrous and diestrus stages. Neurons, fibrous (FA) and protoplasmic astrocytes (PA) of hypothalamus arcuate (AN) and preoptic (PN) nuclei have been examined with electron microscope. It has been shown that after stress influence and estrous as well as diestrus stages the neurons nuclei cross-sectional area increasis. Opposite, under stress FA and PA cross-sectional area of AN and PN is increased in animals at estrus stage, but decreased at diestrus stage. At diestrus stage FA AN cross-sectional area of nuclei increases in control, but not in stressed animals. Nuclei cross-sectional area of of FA PN and PA AN and PN decreases at diestrus in control and in stress. It was also been shown that nuclei cross-sectional area of PA is significantly less than that merit of FA. These differences are unveracious in PA AN stressed animals at diestrus stage, which is associated with the overall decrease in this parameter in astrocytes of this group. Together with this, the number of nuclear pores decreases in FA PN, but not AN during stress independently of estrous cycle. Protoplasmic astrocytes PN have larger nuclear shape ratio compared to fibrous astrocytes. In AN this trend manifests itself only in rats at diestrus stage, not stressed. Fibrous astrocytes are characterized by generally higher density of nuclear pores than in protoplasmic astrocytes, but these differences are veracious only in arcuate nucleus of stressed animals at estrus stage. Also fibrous astrocytes PN have veraciously lower density of nuclear pores than FA AN at diestrus stage. Under stress, this trend becomes unveracious.

THE INFLUENCE OF STEROIDS ON VASCULAR TENSION OF ISOLATED SUPERFICIAL VEINS OF THE NOSE AND FACE DURING THE ESTROUS CYCLE OF GILTS

Waldemar J. Grzegorzewski¹, Jolanta Chłopek¹, Anna Tabęcka-Łonczyńska²,
Stanisława Stefańczyk-Krzymowska¹

¹*Department of Local Physiological Regulation. Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences. 10-747 Olsztyn. Poland*

²*Department of Animal Physiology and Reproduction. University of Rzeszów. 35-310 Rzeszów. Poland*

The arrangement of the superficial facial veins enables blood flow from the nasal cavity into the peripheral circulation by two pathways: through the frontal vein into the cavernous sinus and through the facial vein into the external jugular vein. The present study was designed to determine whether estradiol and progesterone affect the vascular tone of the superficial veins of the nose and face in cycling gilts and to analyze the immunolocalization of progesterone receptors and estradiol receptors in these veins. The influence of hormones on vascular tension differed depending on the type of vessel and the phase of the estrous cycle. Estradiol decreased vascular tension in the nasal vein during the follicular phase ($P < 0.05$) and increased tension in the frontal vein during the luteal phase ($P < 0.05$). Progesterone increased the vascular tension of the frontal vein ($P < 0.05$) and decreased the tension of the other veins ($P < 0.05$) in both phases of the cycle. Expression of estradiol receptor β but not of progesterone receptor was observed in the superficial veins of the nose and face. In conclusion the effect of ovarian steroid hormones on the vascular tension of the superficial veins of the nose and face in female pigs as well as the reactivity of these veins to steroid boar pheromones can affect the blood supply from the nasal cavity to the venous cavernous sinus. We propose that the ovarian steroid hormones that modulate the vascular tension of the nasal and facial veins may also influence the action of boar pheromones absorbed into the nasal mucosa in gilts and may reach the brain via local destination transfer.

WPLYW CENTRALNEGO PODANIA IL-1 β NA EKSPRESJĘ GENU GnRH W PODWZGÓRZU I NA SEKRECJĘ HORMONÓW GONADOTROPOWYCH LH I FSH U ANESTRALNYCH OWIEC

A. Herman, T. Misztal, D. Tomaszewska-Zaremba

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego, PAN, 05-110
Jabłonna*

Wprowadzenie. Stres immunologiczny jest często przyczyną zaburzenia rozrodu u ludzi i zwierząt. Jedną z kluczowych cząstek zaangażowanych w komunikację pomiędzy układem immunologicznym i rozrodczym może być interleukina -1 β (IL-1 β), syntetyzowana przez komórki należące do obu tych układów. Obecność receptorów IL-1 β stwierdzono na wszystkich poziomach osi podwzgórze – przysadka – gonady (HPG). Wydaje się zatem, że IL-1 β może obniżać sekrecję gonadoliberyny (GnRH) w podwzgórze, przez co prowadzić do zmian w sekrecji hormonów luteinizującego (LH) i folikulotropowego (FSH) z przysadki.

Cel pracy. Zbadanie wpływu centralnego podania (icv.) IL-1 β na ekspresję genu GnRH w strukturach podwzgórze: okolicy przedwzrokowej (POA), brzuszno-przyśrodkowym podwzgórze (MBH), przednim podwzgórze (AHA) i wyniosłości przyśrodkowej (ME), na intensywność translacji GnRH w POA, a także na sekrecję hormonów LH i FSH u anestralnych owiec.

Materiały i metody. Owcom (n = 22) podano IL-1 β w dawkach: 10 μ g, icv. (n = 6); 50 μ g, icv. (n = 6) lub płyn Ringera, icv. (n = 10). Zbiórkę krwi prowadzono co 15 min począwszy na 2 h przed podaniem, a następnie 3 h po podaniu IL-1 β lub płynu Ringera. Następnie doświadczenie powtórzono, a owce ubito 2h po centralnej iniekcji i niezwłocznie pobrano struktury podwzgórze oraz przednie przysadki (AP). Dla wyznaczenia profilu translacji GnRH owcom (n = 10) pobrano POA 2h po podaniu IL-1 β w dawce 50 μ g, icv. (n = 5) lub płynu Ringera, icv. (n = 5). Stężenie LH i FSH oznaczono metodą RIA. Poziom mRNA dla GnRH wyznaczono metodą Real-Time PCR.

Wyniki. Po centralnej iniekcji IL-1 β stwierdzono: obniżenie ilości mRNA dla GnRH w POA i ME; zmniejszenie intensywności translacji GnRH w POA; spadek ekspresji genu kodującego podjednostkę LH β w AP; obniżenie poziomu mRNA dla FSH β przy dawce IL-1 β 50 μ g w AP. Po podaniu icv. IL-1 β nie stwierdzono zmian w obwodowym poziomie hormonów gonadotropowych.

Wnioski. Prezentowane badania wykazały, że IL-1 β jest ważnym negatywnym regulatorem aktywności osi HPG u anestralnych owiec, a jej działanie jest raczej ukierunkowane na hamowanie posttranskrypcyjnych etapów syntezy GnRH.

EXPRESSION OF OREXIN RECEPTOR 2 (OX2R) GENE IN THE PORCINE HYPOTHALAMUS DURING THE OESTROUS CYCLE

Tadeusz Kamiński, Nina Smolińska, Anna Nitkiewicz, Jadwiga Przała

*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn-Kortowo, Poland*

Orexin A and B are hypothalamic peptides involved in the control of food intake, sleep patterns, autonomic and neuroendocrine systems. The biological actions of orexins are mediated *via* two G-protein coupled receptors, termed orexin receptor 1 (OX1R) and orexin receptor 2 (OX2R). The present study analyzed by quantitative real time PCR OX2R mRNA expression in porcine hypothalamic structures engaged in GnRH production and secretion, pre-optic area (POA), mediobasal hypothalamus (MBH), and stalk median eminence (SME) on days 2-3, 10-12, 14-16, and 17-19 of the oestrous cycle. Total RNA was extracted from all collected tissues and reverse-transcribed into cDNA. Quantitative real time PCR analysis was performed with SYBR Green. A constitutive expression gene, the GAPDH, was used as internal control to verify the quantitative real time PCR. The specificity of amplification was tested at the end of the PCR by melting-curve analysis. PCR-amplified DNA was sequenced in both directions to confirm the accuracy of amplification. Comparison of the PCR-amplified DNA sequence to that in the database indicated 99% homology at the nucleotide level. Among three examined hypothalamic structures: MBH, POA and SME, changes in OX2R mRNA expression throughout the oestrous cycle were observed in POA and SME. The expression peak in POA and SME occurred on days 17-19 (POA: $p < 0.05$ compared to the all remaining stages; SME: $p < 0.05$ compared to days 10-12). The lowest concentration of the mRNA in POA was found on days 2-3 ($p < 0.05$ vs. the all studied stages), while in SME on days 10-12 ($p < 0.05$ vs. days 17-19). Comparing the gene expression in the three hypothalamic structures, the lowest mRNA content was noted in SME (days 2-3: $p < 0.05$ vs. MBH; the three last studied stages: $p < 0.05$ vs. MBH and POA), while the highest concentration in POA on days 10-12, 17-19 ($p < 0.05$ compared to MBH and SME), and days 14-16 ($p < 0.05$ compared to SME). On days 2-3 the highest expression of the OX2R gene was observed in MBH ($p < 0.05$ relative to SME). The present findings provide the evidence that OX2R mRNA occurs in hypothalamic structures engaged in the control of reproduction in the pig and indicate the dependence of the orexin receptor expression on the endocrine reproductive state.

This research was supported by Ministry of Science and Higher Education (projects no: NN308122134, 528-0206.0805)

EFFECT OF INTRACEREBROVENTRICULAR INFUSION OF OREXIN-A ON PLASMA GONADOTROPHINS LEVELS IN MATURE FEMALE RATS

Lidia Martyńska, Ewa Wolińska – Witort, Magdalena Chmielowska,
Wojciech Bik, Elżbieta Wasilewska – Dziubińska, Jerzy Elbanowski*,
Bogusława Baranowska

*Department of Neuroendocrinology; *Department of Medical Informatics and
Biomathematics; Medical Center of Postgraduate Education, Marymoncka
99/103, 01-813 Warsaw, e-mail: zncmkp@op.pl*

Orexin-A, hypothalamic peptide, except of its strong orexigenic properties is believed to play a role in the reproduction. The aim of present study was to investigate the effect of intracerebroventricular (ICV) infusion of orexin-A on plasma LH and FSH levels in the mature female rats: ovariectomized (OVX) and ovariectomized and estrogenized (OVX+E). Female Wistar rats, 3 months old, were infused with: OxA, BIBP3226 (selective inhibitor Y1 receptor NPY), OxA + BIBP3226 or artificial cerebrospinal fluid – CSF (control; n= 10 each group). Substances at concentrations of 1 µg in 5µl CSF were administered into the 3rd ventricle of the brain of rats for 5 min (1µl/min). One hour after the infusion animals were decapitated, and trunk blood samples were collected. Plasma LH and FSH concentrations were determined by RIA. Only FSH level was significantly ($P<.0,05$) lower in orexin- infused groups compared to controls (CSF only); in OVX as well as OVX+E. FSH plasma concentration was reduced by 40% compared to the level in control (CSF) group. The administration of BIBP3226 with OxA change the effect of OxA on FSH level; BIBP3226 decreased the inhibitory impact of OxA on FSH secretion in OVX and OVX+E groups. Our results show that ICV infusions of orexin-A suppress the release of FSH. Thus, it could be suggested that orexin-A serves as a regulator of the activity of the hypothalamo - pituitary axis in mature female rats and this effect may be partly mediated through the NPY (Y1) receptor.

This study was supported by 501-1-1-27-29/07 Medical Center of Postgraduate Education grant.

**UDZIAŁ SALSOLINOLU (POCHODNEJ DOPAMINY)
W MECHANIZMIE HAMOWANIA SEKRECJI GnRH/LH U OWCY
W OKRESIE LAKTACJI**

Tomasz Misztal¹, Konrad Górski¹, Edyta Molik², Katarzyna Romanowicz¹

¹*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonie;*

²*Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

Salsolinol (1-metylo,6,7-dihydroksy-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina, SAL) jest związkiem katecholowym, syntetyzowanym w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) z dopaminy. Badania wykonane przez nasz zespół wykazały wysokie stężenie SAL w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu u owcy w okresie laktacji. Dobrze opisaną funkcją tego związku, w wyżej wymienionym okresie, jest stymulowanie sekrecji prolaktyny. Obecna hipoteza zakłada, że zmieniona aktywność układu dopaminergicznego podczas laktacji wpływa również na aktywność wydzielniczą podwzgórzowo-przysadkowego układu gonadotropowego GnRH/LH. Celem doświadczenia było zablokowanie działania SAL w OUN i określenie zmian koncentracji LH we krwi obwodowej u laktującej owcy.

U ciężarnych owiec (n=7) implantowano chirurgicznie stalową kaniulę, prowadzącą do trzeciej komory mózgowej. Dokomorową infuzję związku antagonizującego działanie SAL – 1-metylo-3,4-dihydroizochinolina (1-MeDIQ) oraz infuzję kontrolną płynu Ringera-Locke'a wykonano u owiec-matek w piątym tygodniu laktacji. Wszystkie infuzje wykonywane były seryjnie: 30 min infuzji i 30 min przerwy przez 5 godzin, obejmując okres przed karmieniem jagniąt (ssaniem), od godz. 10.00 do godz. 12.30, oraz okres karmienia do woli, od godz. 12.30 do godz. 15.00. Jagnię miało uniemożliwiony dostęp do wymienia matki od godz. 9.00. U owiec-matek wykonano także 5-godzinną kolekcję próbek krwi, co 10 minut, w których oznaczono stężenie LH metodą radioimmunologiczną.

Średnie (\pm SEM) stężenie LH we krwi owiec-matek, którym wykonano infuzję kontrolną, utrzymywało się na podobnym poziomie przed i w okresie karmienia jagniąt, odpowiednio: $5,09 \pm 0,13$ i $4,97 \pm 0,14$ ng/ml. U owiec-matek, którym infundowano 1-MeDIQ, stwierdzono istotnie ($P < 0,001$) wyższe stężenia LH, niż u owiec kontrolnych, zarówno przed jak i w okresie karmienia, odpowiednio: $6,74 \pm 0,13$ i $5,97 \pm 0,14$ ng/ml. Ponadto, stężenie LH we krwi tych owiec obniżyło się istotnie ($P < 0,001$) w okresie karmienia jagniąt, w porównaniu do stężenia przed karmieniem. Wyniki te sugerują, że SAL może być jednym z czynników hamujących aktywność sekrecyjną układu GnRH/LH u owcy w okresie laktacji. SAL nie jest głównym czynnikiem hamującym w okresie ssania.

SIŁA KISSPEPTYNY W PROCESACH ROZRODU

Jolanta Polkowska

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN,
05-110 Jabłonna*

Odkąd kisspeptyna weszła na scenę endokrynologii rozrodu w 2003r, jej rola jako kluczowego regulatora różnorodnych aspektów rozrodu a przede wszystkim stymulacji sekrecji GnRH/LH u samicy była stopniowo odkrywana i dokumentowana. Rodzina peptydów zwanych kisspeptynami to produkty genu KiSS-1 mających powinowactwo do receptora GPR54. Rola systemu KiSS-1//GPR54 działającego głównie w podwzgórzu, została zbadana na wielu gatunkach ssaków, w tym człowieka, zarówno u samca jak i samicy. W niniejszej pracy o charakterze przeglądowym omówiono kluczową rolę tego systemu w rozrodzie samicy, a szczególnie działanie kisspeptyny na oś podwzgórze-przysadka-gonady (HPG). Uważa się, że najważniejsza funkcja kisspeptyny dotyczy procesu zapoczątkowania dojrzałości płciowej (puberty) co wiąże się z jej modulacją przez czynniki metaboliczne i środowiskowe w tym okresie. Omówiono także wpływ kisspeptyny na dynamiczne zmiany w osi HPG u dojrzałej samicy w czasie cyklu płciowego i ich powiązanie z pętlą zwrotną. Na koniec przedstawiono badania o charakterze morfologiczno-fizjologicznym dotyczące lokalizacji i działania sieci neuronów kisspeptyny w podwzgórzu ssaków i ich kontaktem z neuronami GnRH.

EFFECT OF MELATONIN ON THE LEVEL OF THYROID HORMONES IN THE CEREBROSPINAL FLUID IN EWES

Skipor Janina¹, Misztal Tomasz², Kaczmarek Monika M¹

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

²*The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy
of Sciences, Jabłonna n/Warsaw*

The present study aims to analyze the effect of melatonin on the concentrations of thyroid hormones in the blood and cerebrospinal fluid (CSF) during the natural photoperiodic transition from long to short days. To that purpose, we increased the concentration of melatonin by administration of subcutaneous solid implants, a treatment well known to advance the breeding season in sheep. Melatonin was implanted twice in the test group (n=8) in May and July, while control group (n=8) was not treated. We used a technique that allowed for repeated sampling of the CSF from the third ventricle of the brain and, in parallel, blood samples from the jugular vein. Both collections were made in one-month intervals, since May (before melatonin treatment) to August. The total (T) and free (f) fractions of T4 and T3 were assayed. Due to the relationships between thyroid hormones and their binding/transporter protein, transthyretin (TTR) at the level of the ventricles, mRNA expression of this transporter was measured in the choroid plexus of melatonin-treated and untreated groups.

Melatonin implantation in May and July mainly prevented the decrease in plasma fT3 and TT3 exhibited in untreated group, and induced a limited decrease in TT4 in June. By contrast, melatonin implantation prevented the decrease in CSF fT3 observed in the untreated group. No effect of melatonin was found on the expression of TTR mRNA in the choroid plexus. There were a correlations between blood fT4 and CSF TT4 concentrations in both control and melatonin treated group ($r^2 = 0.4$; $p < 0.01$ vs. $r^2 = 0.14$; $p < 0.05$), as well as between blood fT3 and CSF TT3 concentrations but only in the melatonin-treated group ($r^2 = 0.26$; $p < 0.02$).

In conclusion, the active form of the hormone T3 within the brain is regulated by melatonin independently of the peripheral changes within the blood. The lack of correlation between plasma fT3 and CSF TT3 in the control group suggests that an increase in local T3 conversion could contribute as an additional source of T3 in the CSF during the period of increasing day length. These data seem to confirm a local nature for recently discovered connections between the pineal melatonin signal and thyroid-dependent seasonal biology in mammals.

* Badania finansowane ze środków MNiSW (Projekt N308 020 31/1984)

OREXIN TYPE 2 RECEPTOR PROTEIN EXPRESSION IN THE PORCINE PITUITARY GLAND DURING THE OESTROUS CYCLE

Nina Smolinska, Anna Nitkiewicz, Jadwiga Przala, Tadeusz Kaminski

*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
10-718 Olsztyn-Kortowo, E-mail: nina.smolinska@uwm.edu.pl*

Orexin A and B are associated with the stimulation of food intake and arousal. Orexins' actions are mediated *via* G protein-coupled receptors, termed orexin receptor 1 (OX1R) and orexin receptor 2 (OX2R). OX1R is selective for orexin A, whereas OX2R binds both orexins with similar affinity. There is evidence indicating that orexins act on some pituitary functions and their receptors fluctuate throughout the oestrous cycle. Most results concerning the orexin system in the pituitary have been obtained from studies on rodents and humans. Since no studies have been done concerning the presence of orexin receptors in the porcine pituitary, we compared the expression levels of OX2R protein by Western blotting in anterior (AP) and posterior pituitary (NP) during days 2-3, 10-12, 14-16, and 17-19 of the oestrous cycle. Denatured protein preparations extracted from the porcine AP and NP, were resolved by SDS-PAGE (12.5%) and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 5 h in TBST containing 5% skimmed milk powder, then overnight with mouse polyclonal antibodies to OX2R at a dilution of 1:300 or rabbit polyclonal antibodies to actin at a dilution of 1:200, which were used as an internal control. To identify immunoreactive bands, membranes were incubated for 1.5 h with goat anti-mouse IgG for OX2R (diluted 1:500) or goat anti-rabbit IgG for actin (diluted 1:5000) conjugated with alkaline phosphatase. The immunocomplexes were visualized using NBT and BCIP. The results of Western blotting were quantified by densitometric scanning of immunoblots with GelScan for Windows ver. 1.45 software. Data were expressed as a ratio of OX2R protein relative to actin protein in arbitrary optical density units. OX2R protein in AP was most abundant on days 10-12 and 17-19 compared to days 2-3 and 14-16 of the oestrous cycle ($p < 0.05$), but most abundant in NP on days 10-12 ($p < 0.05$ compared to days 2-3 and 17-19) and lowest on days 17-19 ($p < 0.05$). Further, OX2R protein was more abundant ($p < 0.05$) in AP than NP during the oestrous cycle. In conclusion, our results might suggest that orexins can participate in the control of pig reproduction by exercising their action at the pituitary level and have a direct effect on these organ during the oestrous cycle. Moreover, changes in OX2R protein expression in the porcine pituitary strongly suggest that its sensitivity to orexins varies throughout the oestrous cycle.

This research was supported by Ministry of Science and Higher Education (project No N N308 122134, 2008-2011).

WPŁYW HORMONÓW JAJNIKOWYCH NA PODWZGÓRZOWO-GONADOTROPOWE MECHANIZMY ROZWOJU JAGNIĄT SSĄCYCH W CZASIE ODCHOWU

Marta Wańkowska, Anna Wójcik-Gładysz, Tomasz Misztal, Katarzyna Romanowicz, Jolanta Polkowska

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska
Akademia Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna*

Ujemne sprzężenie zwrotne estradiolu z ośrodkowymi czynnikami gonadotropowymi odgrywa kluczową rolę w procesie wydzielania hormonów luteinizującego (LH) i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (FSH) w okresie postnatalnego rozwoju przed procesem dojrzewania płciowego u samic. Celem pracy było sprecyzowanie morfologiczno-czynnościowych współzależności w ramach sprzężenia zwrotnego w układzie podwzgórzowe neurony gonadoliberynowe (GnRH) – komórki gonadotropowe – hormony jajnikowe u jagniąt w czasie odchowu przy matce. Badania przeprowadzono na jagniętach z usuniętymi jajnikami (OVX) na początku 6. tygodnia życia oraz jagniętach w stanie normy fizjologicznej (n=10). Materiały uzyskane w wyniku kolekcji krwi obwodowej w 6. i 9. tygodniu życia oraz dysekcji pola przedwzrokowego (POA)-podwzgórza (HA) i przysadki mózgowej w 9. tygodniu życia, analizowano za pomocą: (i) histochemicznego oznaczania mRNA (hybrydyzacja in situ), hormonów i receptorów estradiolowych α ($ER\alpha$) w POA-HA i/lub przysadce mózgowej (GnRH; LH, FSH, $ER\alpha$, LH/ $ER\alpha$, FSH/ $ER\alpha$, mRNA dla LH β i FSH β) oraz (ii) radioimmunologicznego oznaczania LH i FSH w osoczu krwi. Wyniki: Liczba elementów neuronowych immunoreaktywnych (ir) dla GnRH w POA była większa a w wyniosłości pośredniej (ME) była mniejsza u zwierząt z usuniętymi gonadami ($p < 0.01$). Obserwowano większe stężenie LH we krwi, mniejszą populację gonadotropów ir dla LH \square i LH \square / $ER\alpha$ oraz większą populację gonadotropów wybarwionych dla mRNA LH \square u jagniąt OVX ($p < 0.05$). Większemu stężeniu FSH we krwi ($p < 0.001$) i większej liczbie gonadotropów wybarwionych dla mRNA FSH \square ($p < 0.05$) nie towarzyszyły istotne zmiany dotyczące komórek ir dla FSH \square i FSH \square / $ER\alpha$ u jagniąt OVX w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie LH i FSH u zwierząt kontrolnych pozostawało na podobnym poziomie w 6. i 9. tygodniu życia. Wnioski: Działanie hormonów jajnikowych na gonadotropowe mechanizmy rozwoju jagniąt ssących polega na hamowaniu neurosekrecji GnRH oraz syntezy i uwalniania LH i FSH przy równoczesnym stymulowaniu składowania LH w gruczole przysadki mózgowej.

Praca była dotowana przez MNiSW z projektu badawczego nr N311 004 32/0224

WPLYW HORMONÓW JĄDROWYCH NA PODWZGÓRZOWO-GONADOTROPOWE MECHANIZMY ROZWOJU JAGNIĄT SSĄCYCH W CZASIE ODCHOWU

Marta Wańkowska, Anna Wójcik-Gładysz, Tomasz Misztal, Katarzyna Romanowicz, Jolanta Polkowska

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska
Akademia Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna*

Sprzężenie zwrotne testosteronu z ośrodkowymi czynnikami układu gonadotropowego odgrywa kluczową rolę w procesie sekrecji hormonów gonadotropowych luteinizującego (LH) i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (FSH) w okresie postnatalnego rozwoju płciowego u samców. Celem pracy było sprecyzowanie morfologiczno-czynnościowych współzależności w ramach sprzężenia zwrotnego w układzie podwzgórzowe neurony gonadoliberynowe (GnRH) – komórki gonadotropowe – hormony jądrowe u jagniąt ssących w czasie odchowu przy matce. Badania przeprowadzono na grupie jagniąt z usuniętymi jądrami na początku 6. tygodnia życia (OCX) oraz grupie jagniąt w stanie normy fizjologicznej (n=10). Materiały uzyskane w wyniku kolekcji krwi obwodowej w 6. i 9. tygodniu życia oraz dysekcji pola przedwzrokowego (POA)-podwzgórza (HA) i przysadki mózgowej w 9. tygodniu życia, analizowano za pomocą: (i) histochemicznego oznaczania mRNA (hybrydyzacja *in situ*), hormonów w POA-HA i przysadce mózgowej (GnRH; LH, FSH, mRNA dla LH β i FSH β) oraz (ii) radioimmunologicznego oznaczania LH, FSH i testosteronu w osoczu krwi. Wyniki: Liczba perykarionów, neurytów i zakończeń nerwowych immunoreaktywnych (ir) dla GnRH w POA-HA była mniejsza u zwierząt OCX (p<0.01). Obserwowano większe stężenie LH we krwi oraz mniejszą populację gonadotropów ir dla LH β u jagniąt OCX (p<0.05). Populacja gonadotropów wybarwionych dla mRNA LH β była bardzo duża u wszystkich jagniąt. Większemu stężeniu FSH we krwi (p<0.001) towarzyszyła większa liczba gonadotropów ir dla FSH β i wybarwionych dla mRNA FSH β (p<0.01) u jagniąt OCX w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie LH i testosteronu u zwierząt z grupy kontrolnej wzrosło od 6. do 9. tygodnia życia (p<0.05), podczas gdy stężenie FSH pozostawało na podobnym poziomie. Wnioski: Działanie hormonów jądrowych na gonadotropowe mechanizmy rozwoju jagniąt w czasie odchowu przy matce polega na hamowaniu neurosekrecji GnRH oraz uwalniania obu gonadotropin przy równoczesnym stymulowaniu składowania LH i hamowaniu syntezy i składowania FSH w gruczole przysadki mózgowej.

Praca była dotowana przez MNiSW z projektu badawczego nr N311 004 32/0224

**WALPROINIAN SODU (VPA) HAMUJE ZALEŻNE OD GnRH
UWALNIANIE LH Z KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI
SAMICY SZCZURA *IN VITRO* NIEZALEŻNIE OD WPŁYWU NA
AKTYWNOŚĆ SZLAKU IP₃/PKC**

Elżbieta Wasilewska-Dziubińska¹, Alina Gajewska², Anna Herman², Ewa
Wolińska-Witort¹, Magdalena Chmielowska¹, Lidia Martyńska¹, Kazimierz
Kochman²

¹*Zakład Neuroendokrynologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia
Podyplomowego, ul. Marymoncka 99/103 01-813 Warszawa. e-mail:
ewdzncmkp@op.pl*

²*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J.Kielanowskiego Polska Akademia
Nauk ul.Instytucka 3, 05-110 Jabłonna*

Dostępne dane wskazują, że stosowany w leczeniu padaczki VPA może wywoływać efekty uboczne łącznie z zaburzeniami funkcjonowania układu rozrodczego u kobiet. Wykazano, że długotrwałe podawanie VPA samicom szczura prowadzi do torbielowatości jajników. VPA wpływa także bezpośrednio na metabolizm steroidów gonadowych hamując konwersję testosteronu do estradiolu, co obserwowano w komórkach pęcherzykowych jajnika świni. W naszych wcześniejszych pracach wykazaliśmy, że dożylne podawanie VPA owariektomizowanym samicom szczura prowadzi do zmniejszonego uwalniania LH i FSH z przysadki *in vivo*. Stwierdziliśmy również, że VPA hamuje stymulowane przez GnRH uwalnianie LH z komórek przedniego płata przysadki samic szczura *in vitro*. Dane te sugerują, że wewnątrzkomórkowym mechanizmem odpowiedzialnym za inhibicję gonadotropowej funkcji przysadki mógłby być szlak IP₃/PKC. Dlatego też celem podjętych badań była charakterystyka zmian stężenia LH w płynie inkubacyjnym oraz fosfoinozytoli w komórkach gonadotropowych podanych działaniu różnych stężeń VPA, oraz 100 nM GnRH. w obecności VPA. Otrzymane wyniki wykazały, że stymulacja komórek gonadotropowych samym VPA nie hamuje uwalniania LH, jednakże efekt ten pojawia się w komórkach traktowanych łącznie przez 100nMGnRH i 1000nMVPA. Obniżonemu stężeniu LH w płynie inkubacyjnym nie towarzyszyło jednak zahamowanie wewnątrzkomórkowej syntezy fosfoinozytoli. Analiza aktywności szlaku IP₃/PKC wykazała bowiem, że synteza fosfoinozytoli w komórkach traktowanych samym VPA jak też GnRH w obecności VPA była znacząco wyższa od wartości stwierdzonej w grupie kontrolnej. Ponadto, poziom syntezy fosfoinozytoli w komórkach przysadki nie zależał od dawki VPA i nie różnił się w stosunku do stężenia obserwowanego w komórkach stymulowanych samym GnRH jak i GnRH w obecności VPA. Uzyskane dane sugerują, że VPA stymuluje aktywność szlaku IP₃/PKC w komórkach gonadotropowych, zatem mechanizm odpowiedzialny za hamujący wpływ VPA na stymulowane przez GnRH uwalnianie LH wymaga dalszych badań. Nie można wykluczyć bezpośredniego działania VPA na kanały wapniowe w komórkach przysadki.

Praca finansowana w ramach projektu CMKP nr 501-1-1-31-58/09

MASA I WYMIARY JĄDER KNURKÓW PODDANYCH DZIAŁANIU AGONISTY GnRH

Ryszard Tuz

*Katedra Hodowli Trzody Chlewniej i Małych Przeżuwaczy, Uniwersytet Rolniczy,
30-059 Kraków, al. A. Mickiewicza 24/28*

Brak powszechnej akceptacji na prowadzenie tuczu młodych knurów mimo niewątpliwych korzyści wynika z możliwości wystąpienia niepożądanego zapachu w mięsie i tłuszczu, powodującego obniżenie jakości tuszy, a nawet jej dyskwalifikację. Dotychczas stosowanym sposobem pozbycia się zapachu knurzego w tkankach osobników płci męskiej jest kastracja chirurgiczna.

W ostatnich latach coraz częściej podnoszona jest potrzeba zwiększenia dobrostanu zwierząt a w jego ramach możliwości wykonywania kastracji prosiąt płci męskiej w sposób inny niż dotychczasowy.

Celem niniejszej pracy było zahamowanie rozwoju somatycznego układu płciowego knurków poprzez zastosowanie agonisty GnRH (desloreliny). Badaniami objęto 24 knurki mieszańce ras pbz x (Duroc x Pietrain). Utworzono cztery grupy zwierząt po 6 sztuk w każdej. Grupę pierwszą (I3) stanowiły zwierzęta, które zostały poddane działaniu GnRH w 91 dniu życia, knurkom należącym do grupy drugiej oznaczanej jako I 4 implantacje wykonano cztery tygodnie później (119 dzień życia) a w grupie III (I 5) w 147 dniu życia. Pozostałe knurki wchodziły w skład grupy kontrolnej (K). Bezpośrednio po uboju (w 25 tygodniu życia) od wszystkich knurków wypreparowano narządy płciowe i poddano ocenie morfologicznej.

Poddanie knurków działaniu desloreliny w formie długoterminowego implantu spowodowało statystycznie wysoko istotne ($P \leq 0,01$) zróżnicowanie mas i wymiarów jąder w porównaniu do grupy kontrolnej (K) bez względu na długość okresu implantacji. Średnia masa jądra stwierdzona u ocenianych osobników w przypadku grupy I3 stanowiła 18,22%, w grupie I4 – 21,78% a w grupie I5 – 57,02 % średniej masy jądra knurków grupy kontrolnej. Analiza wymiarów jąder wykazała, że osobniki z grupy I3, jak również zwierzęta należące do grupy I4, osiągając wiek 6 miesięcy posiadały jądra, których długość mierzona wraz z najądrzem oraz szerokość odpowiadały wymiarom jąder knurków grupy kontrolnej określanym przyżyciowo w wieku pomiędzy 105 a 119 dniem. Natomiast u osobników z grupy I5 wymienione wymiary jąder były porównywalne z wymiarami jąder knurków grupy kontrolnej w wieku około 4 i pół miesiąca.

Sesja 3

Oddziaływanie ksenobiotyków środowiskowych na rozród

Przewodniczący:

Prof. dr hab. Luiza Dusza

Prof. dr hab. Ewa Gregoraszczyk

ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AhR) PROTEIN EXPRESSION IN THE HYPOTHALAMUS-PITUITARY-OVARIAN AXIS IN PIGS

Olga Jabłońska, Joanna Piasecka, Anna Nynca, Renata Elżbieta Ciereszko

Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn, Poland

The Ah receptor is a ligand-activated transcription factor mediating toxic effects of many environmental pollutants including dioxins. It was also demonstrated that the AhR may play a significant role in the regulation of reproductive processes in females. The aim of the study was to examine the protein expression levels of the AhR in the hypothalamus, pituitary and ovary (follicle, corpus luteum, ovarian stroma) during the follicular (Days 16-19; n=4) and luteal (Days 8-10; n=4) phase of the porcine estrous cycle. The examined organs were provided by pigs after two controlled estrous cycles. The organs were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The AhR protein expression level in tissues was analyzed by Western blotting. Organ samples were homogenized in lysis buffer. Total protein extract (20 µg of each sample) was separated by SDS-PAGE electrophoresis and transferred into nitrocellulose membrane. The membranes were first immunostained with primary rabbit polyclonal anti-AhR antibodies and, then with secondary, alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit antibodies. Reactive bands were visualized using NBT-BCIP reagents. The intensity of the bands was analyzed densitometrically. One-way ANOVA followed by the least significant difference (LSD) post hoc test was used to compare the AhR protein expression among porcine tissues during each phase of the estrous cycle. Examinations of tissues collected during the follicular phase revealed that the highest level of AhR protein was found in anterior pituitary and in ovarian follicle, while the lowest level was demonstrated in the hypothalamus. During the luteal phase, the AhR protein expression was the highest in pituitary (anterior and posterior lobes) and the lowest in hypothalamus and ovarian stroma. The study demonstrated differentiated AhR protein expression levels in particular parts of the hypothalamus-pituitary-ovarian axis as well as during different phases of the porcine estrous cycle. We suggest that AhR may play a significant role in the regulation of female reproduction.

This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education (grant No N N311 317836) and by the European Union within the European Social Fund for O.J.

WPLYW PODANIA MIESZANINY PCB *IN OVO* NA WYLĘGOWOŚĆ I STĘŻENIE HORMONÓW TARCZYCY WE KRWI JEDNODONIOWYCH PISKLAT

Marcin W. Lis¹, Andrzej Sechman², Danuta Wątor¹, Karolina Głodek¹,
Jerzy W. Niedziółka¹

¹*Katedra Hodowli Drobiu, Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny,* ²*Katedra
Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

Uważa się, że wrażliwość organizmu na działanie związków z grupy polichlorowanych bifenyli (PCB) jest szczególnie duża w okresie embrionalnym i postnatalnym, ponieważ w tym czasie mechanizmy detoksykacyjne nie są jeszcze całkowicie ukształtowane. Już w 1973 roku Platonow i Reinhard (Can. J. Comp. Med. 37) wykazali, że u kur żywionych paszą z dodatkiem Alocloru 1254 (mieszanina PCB zawierająca 54% Cl) następuje dawko-zależna akumulacja PCB w jajach wylęgowych. U ssaków wykazano, że PCB wpływają na funkcję tarczycy, obwodowy metabolizm jodotyronin i wykazują wysokie powinowactwo do białek przenoszących hormony tarczycy we krwi. U ptaków wpływ PCB na czynność tarczycy nie został w pełni wyjaśniony. Dlatego też celem prezentowanych badań była próba odpowiedzi na pytanie, czy iniekcja Alocloru 1254 „*in ovo*” w początkowej fazie embriogenezy wpływa na wylęgowość oraz stężenie tyroksyny (T₄) i trójjodotyroniny (T₃) we krwi jednodniowych pisklat.

Aloclor 1254 podawano *in ovo* do jaj kurzych w dawkach 0 (kontrola), 10, 100, 1000 ng/50 µl oleju arachidowego/jajo (n=90 jaj/grupę) w 4 dniu embriogenezy (E4). Inkubację prowadzono w standardowych warunkach. Krew pobierano od 10 jednodniowych pisklat losowo wybranych z każdej grupy. Stężenie T₄ i T₃ w osoczu krwi oznaczano metodą radioimmunologiczną stosując zestaw firmy BRAHMS (Niemcy).

Pomimo tego, że iniekcja *in ovo* Alocloru 1254 istotnie (p≤0,05) zwiększyła zamieranie zarodków w okresie klujnikowym (E18-E21; w poszczególnych grupach traktowanych Aloclorem wskaźnik ten wynosił odpowiednio 7,3%, 10,0% i 7,4%), nie wpłynęła ona jednak na ostateczny wskaźnik wylęgowości (P>0,05). Iniekcja Alocloru 1254 w dawce 1000 ng/jajo zmniejszyła stężenie T₄ we krwi jednodniowych pisklat o 30,4% (P≤0,05). Nie stwierdzono natomiast wpływu tej substancji na stężenie T₃ (P>0,05).

Uzyskane wyniki wskazują, że u ptaków podanie mieszaniny polichlorowanych bifenyli *in ovo* w początkowej fazie embriogenezy wpływa na rozwój zarodka oraz na funkcję tarczycy.

Badania sfinansowano z tematu BW 2221/KHDZFiZ/08

MECHANIZM DZIAŁANIA GENISTEINY I DAIDZEINY W KOMÓRKACH KORY NADNERCZY ŚWINI: UDZIAŁ RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH I KINAZ TYROZYNOWYCH W SEKRECJI ANDROSTENDIONU

Barbara Kamińska, Marek Opałka, Luiza Dusza

*Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 1A, 10-957 Olsztyn, e-mail: mareko@uwm.edu.pl*

Genisteina i daidzeina są to roślinne estrogeny, obecne przede wszystkim w roślinach motylkowych. Bogatym źródłem tych związków są soja i jej wysokobiałkowe przetwory, w tym śruta poekstrakcyjna sojowa – powszechny składnik mieszanek pełnoporcjowych dla trzody, drobiu i bydła. Wewnątrzkomórkowe mechanizmy działania fitoestrogenów u zwierząt są zróżnicowane. Fitoestrogeny m.in. mogą w docelowych komórkach łączyć się z receptorami estrogenowymi (ER), dodatkowo genisteina jest uważana za specyficzny inhibitor kinaz tyrozynowych (PTK). U świni genisteina i daidzeina zwiększają sekrecję androstendionu przez komórki kory nadnerczy, jednak udział ER i PTK w tym zjawisku pozostaje niewyjaśniony. *Zwierzęta doświadczalne*: komórki kory nadnerczy pozyskiwano od dojrzałych płciowo loszek świni domowej w fazie lutealnej (n=5) i fazie pęcherzykowej (n=5) cyklu rujowego.

Doświadczenie in vitro: do zawiesiny komórek (300 tys./ml medium F12) dodawano badane substancje: genisteinę lub daidzeinę (5, 10 μ M) z dodatkiem/bez specyficznego antagonisty ER: ICI 182.780 (0,5 μ M). Część komórek inkubowano w obecności inhibitora PTK: Tyrfostinu AG 957 (5, 10 μ M – porównanie działania inhibitora i genisteiny) lub ACTH (5nM – kontrola pozytywna). Komórki inkubowane bez wyżej wymienionych dodatków stanowiły grupę kontrolną. Inkubacje trwały 8h (37°C, 95% powietrza i 5%CO₂). W uzyskanym medium oznaczano stężenie androstendionu metodą radioimmunologiczną.

Wyniki otrzymane w obu grupach loszek były następujące: (1) fitoestrogeny: genisteina i daidzeina oraz ACTH (kontrola pozytywna) powodowały istotny wzrost (p<0,05) sekrecji androstendionu przez izolowane komórki kory nadnerczy świni; (2) ICI 182.780 dodawany do zawiesiny komórek wraz z genisteiną lub daidzeiną, nie wpływał na działanie tych fitoestrogenów; (3) antagonist receptorów estrogenowych - ICI 182.780, nie powodował również zmian w podstawowym wydzielaniu androstendionu, (4) inhibitor kinaz tyrozynowych - Tyrfostin AG 957 w przeciwieństwie do genisteiny istotnie obniżał sekrecję androstendionu przez izolowane komórki kory nadnerczy świni. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na brak udziału ER i PTK w wewnątrzkomórkowych mechanizmach działania fitoestrogenów w korze nadnerczy świni.

Praca finansowana przez MNiSW (projekt badawczy: N N311 296435)

ANDROGENIC PROPERTIES OF SINGLE PBDE CONGENERS IN OVARIAN FOLLICLES

Anna Karpeta., Ewa Ł. Gregoraszczyk

*Department of Physiology and Toxicology of Reproduction, Institute of Zoology,
Jagiellonian University, Kraków, Poland.*

Objective: In the present study, we have evaluated the *in vitro* effects of single PBDE congeners (-47,- 99, -100 and -209) and mixtures of these congeners on P4:T ratio and T:E2 ratio in ovarian follicles.

Material and Methods; Cocultures of theca and granulosa cells collected from medium-sized follicles of cycling pigs were exposed for 24 hrs to three different doses of PBDE-47 (0.5, 25 and 50 ng/ml), PBDE-99 (0.25, 10 and 17.5 ng/ml), PBDE-100 (0.1, 4.0 and 12.5 ng/ml) or PBDE 209 (0.05, 0.25 and 0.5 ng/ml). At the end of the culture, the levels of progesterone (P4), testosterone (T) and estradiol (E2) secreted into culture medium were determined by ELISA

Results: The decrease of P4:T ratio with parallel increase of T:E2 ratio was noted after 24 hrs exposure for all congeners. Surprisingly, after withdraw reagents from medium, increase of P4:T ratio with no effect of T:E2 ratio was observed. Situation is different when cells were exposed for mixture. Increase of P4:T ratio with parallel decrease of T:E2 ratio was noted.

Summary: first, androgenic properties of single congeners and antiandrogenic properties of mixture suggest stimulatory and inhibitory action on 17 β -HSD respectively, second probably due to withdraw reagents from medium, there are no substances stimulated 17 β -HSD and therefore progesterone is not transferred to testosterone and next oestradiol.

Conclusion: Polybrominated dibenzoethers may be responsible for excessive androgen production and consequently polycystic ovarian syndromes.

Acknowledgement. This study was supported by the DS/BiNoZ/K/ZDS/000783, Poland

WPLYW KSENOBIOTYKÓW NA SEKRECJĘ PROGESTERONU (P4) ORAZ OKSYTOCYN (OT) I NA EKSPRESJĘ GENÓW NP-I/OT i PGA W KOMÓRKACH LUTEALNYCH KROWY WE WCZESNEJ CIAŻY

Jarosław Młynarczuk, Michał H Wróbel, Jan Kotwica

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn

Substancje chloroorganiczne stosowane w rolnictwie i przemyśle są trwale obecne w naturalnym środowisku i niekorzystnie wpływają na czynność jajnika i macicy. Zaburzenia te mogą być przyczyną poronień u samic, w organizmach których stwierdzono znaczne ilości ksenobiotyków.

Najpierw badano ekspresję mRNA neurofizyny-I/oksytocyny (NP-I/OT) oraz monoooksygenazy peptydylo-glicylo- α -aminowej (PGA) w tkance lutealnej bezpośrednio po pobraniu oraz w komórkach lutealnych po 24 h inkubacji bez ksenobiotyków. Ponieważ wyniki te nie różniły się, w dalszych pracach użyto modelu hodowli komórkowej. W kolejnym doświadczeniu badano wpływ PCB 77, DDT, DDE i HCH (1 i 10 ng/ml) na sekrecję P4 i OT przez komórki lutealne krowy z 3-5, 6-8 i 9-12 tygodnia ciąży po 48 h inkubacji z ksenobiotykami. Zaś po 8 h inkubacji określono ekspresję genu neurofizyny-I/oksytocyny (NP-I/OT) oraz monoooksygenazy peptydylo-glicylo- α -aminowej (PGA).

Tylko DDE (1 ng/ml) zwiększał ($P < 0.05$) wydzielanie P4, zaś wszystkie ksenobiotyki stymulowały sekrecję OT ($P < 0.05$) z badanych komórek. Wpływało to na zmianę stosunku wydzielanej OT do P4 w 9-12 tygodniu ciąży ($P < 0.05$). Ksenobiotyki (z wyjątkiem HCH) w dawce 10 ng/ml zwiększały ($P < 0.05$) ekspresję genu NP-I/OT w komórkach lutealnych w badanych fazach ciąży, zaś te same ksenobiotyki hamowały ($P < 0.05$) ekspresję genu PGA w 9-12 tygodniu ciąży

Użyte ksenobiotyki stymulują syntezę i sekrecję OT w komórkach lutealnych ciążowego ciała żółtego, co zwiększa stosunek wydzielanej OT do P4. To z kolei, może zwiększać ryzyko poronień we wczesnych stadiach ciąży.

MECHANIZM DZIAŁANIA FITOESTROGENÓW W KOMÓRKACH LEYDIGA GĄSIORÓW: UDZIAŁ RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH

Marek Opałka, Barbara Kamińska, Anna, Leska, Luiza Dusza

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 1A, 10-957 Olsztyn, e-mail: mareko@uwm.edu.pl

Fitoestrogeny, obecne w wielu paszach roślinnych (soja, lucerna, koniczyny), posiadają właściwości podobne do estrogenów zwierzęcych i mogą wpływać na funkcjonowanie układu rozrodczego. Ze względu na obecność pierścieni fenolowych w budowie chemicznej fitoestrogenów, działanie tych związków na komórki może odbywać się, między innymi, po połączeniu się z receptorami estrogenowymi. Wcześniejsze badania (*Opałka i wsp., Reprod. Biol. 2006 6 Suppl. 2: 47-54*) sugerowały, że hamowanie wydzielania testosteronu przez komórki jąder u gąsiorów jest niezależne od receptorów estrogenowych. W celu zweryfikowania powyższej hipotezy badano wpływ fitoestrogenów na sekrecję testosteronu przez komórki Leydiga gąsiorów po zastosowaniu antyestrogenu ICI 182,780 blokującego receptory estrogenowe.

Jądra pobierano od dojrzałych płciowo samców gęsi Białej Kołudzkiej® w czasie sezonu rozplodowego. Izolowane komórki Leydiga (10^5 /ml) inkubowano z ICI 182,780 (100 nM) przez 3 godziny a następnie z fitoestrogenami (5 i 50 μ M): genisteiną oraz daidzeiną przez kolejne 20 godzin. Po zakończonej inkubacji w mediach oznaczono poziomy testosteronu metodą radioimmunologiczną. Istotność różnic określono przy użyciu analizy wariancji.

Genisteina i daidzeina, w obu zastosowanych stężeniach, obniżały wydzielanie testosteronu przez komórki Leydiga gąsiorów. Inhibitor receptorów estrogenowych, ICI 182,780, nie znosił hamującego wpływu fitoestrogenów na sekrecję testosteronu przez inkubowane komórki jądrowe.

Otrzymane wyniki wskazują że działanie fitoestrogenów na steroidogenezę w komórkach Leydiga gąsiorów nie odbywa się poprzez receptory estrogenowe. Potwierdza to nasze wcześniejsze obserwacje dotyczące braku udziału receptorów estrogenowych w mechanizmie działania fitoestrogenów w jądrach samców gęsi.

Praca finansowana przez MNiSW (projekt badawczy: N N311 274034)

ACCUMULATION OF HCB AND PECB IN OVARIAN FOLLICULAR WALL FOLLOWS REPEATED EXPOSURE. COMPARISON OF THE ACTION HCB AND PECB ON ESTRADIOL SECRETION.

Anna Ptak^a, Jerzy Falandysz^b, Ewa Ł. Gregoraszczyk^a

^a*Department of Physiology and Toxicology of Reproduction, Chair of Animal Physiology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Ingardena 6, 30-060 Krakow, Poland*

^b*Department of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, University of Gdańsk, 18 Sobieskiego Str., PL 80-952 Gdańsk, Poland*

Objectives. Hexachlorobenzene (HCB) is an organochlorine fungicide widely used in agriculture and is also used as a softening agent for plastics (Zheng at al. 1999). HCB has been most frequently (80-100% of sample) detected pollutant in the follicular fluid of farm animal (cattle, sheep, goats and pigs) (Kamarianos et al., 2003) and human follicular fluid and serum (Jarrell et al., 1993). Data concerning accumulation this compounds in ovarian follicles and action on steroid secretion are scarce.

The aim of the presented data was to test differences in the accumulation of HCB and its metabolite pentachlorobenzene (PeCB) in the follicular wall. Moreover, compare the action of HCB and PeCB on estradiol secretion.

Methods. The small (SF) and large (LF) preovulatory porcine follicles were incubated in M199 medium + 10%FBS at 37°C with constant shaking at 70rpm, for 4 days. The media were changed every day and repeated dose 1µg/ml of Hexachlorobenzene (HCB) and Pentachlorobenzene (PeCB) was added each day till 4 days of cultured. Media was collected every day and frozen for steroid analysis by RIA and to test HCB and PeCB accumulation. 24h after the last treatment follicles were frozen for further analysis. HCB and PeCB concentrations in the follicular wall and medium were analysis by mass spectrometry.

Results. PeCB was found at a higher level in the tissue (97,2 and 87,2 %) than HCB (57,6 and 41,77%) of total doses in SF and LF follicles respectively. The sum (medium + tissue) of PeCB determinate was almost the same as the total dose PeCB. The sum of HCB determinate was significantly lower than the total dose of HCB. Time- and stage of follicular development- dependent estrogenic and antiestrogenic action of both reagents was noted. Estrogenic action of both was observed till 3 days in SF and only in the first day in LF, than antiestrogenic action was observed.

Conclusion. Differences between the accumulation of HCB and PeCB suggests local metabolism of HCB to PeCB in the follicles. Reduced estradiol levels noted after long term of exposition to both reagents can be responsible for disruption ovarian function.

COMPARISON OF THE ACTION OF PCBS AND PBDES ON 17 β -ESTRADIOL STIMULATED PROLIFERATION IN MCF-7 BREAST CANCER CELLS

Anna Ptak, Karolina Mazur, Anna Wróbel, Patrycja Gut, Ewa Ł. Gregoraszczyk.

*Department of Physiology and Toxicology of Reproduction, Chair of Animal
Physiology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Ingardena 6, 30-060
Kraków, [Poland](#)*

We have analyzed whether PCB118, 138, 153, 180, indicators of polychlorinated biphenyls, and BDE47, 99, 100, 209, indicators of polybrominated biphenyl ethers interfere with the activity of estradiol in proliferation of the MCF-7 cell line by co-treating the cells with E2 and the tested compounds.

MCF-7 human breast cancer cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in DMEM without phenol red supplemented with 5% CDFBS (charcoal-treated bovine serum) medium one day before the administration of the tested compounds, to exclude estrogenic effects via medium, and then the cells were cultured for 3 days with 10nM E2 (Steraloids, Inc., Newport, RI) or 0.1 μ M, 0.5 μ M and 1 μ M tested PCBs congeners or 0.1 μ M, 0.5 μ M and 1 μ M tested PBDEs congeners (LGC Promochem, Wesel, Germany).

Part two of the study was performed by co-treating different doses of PCBs or PBDEs with E2. Cell proliferation was determined by measuring BrdU incorporation (Cell Proliferation ELISA System; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

Increase of cell proliferation was observed under the influence of E2. All PCB congeners added alone increased (dependent on the doses used) cell proliferation compared to the control, while PBDEs had no effect on cell proliferation, except of medium and high doses of BDE99 and BDE209. The additive effect of E2 and all PCB congeners on cell proliferation was observed. In the case of PBDEs there was no interaction with E2 on cell proliferation.

Our in vitro results demonstrated that, the most abundant in the environment, PCB congeners exhibited estrogenic properties, while PBDEs have no effect on cell proliferation. Based on the results of the presented data PCBs but not PBDEs should be taken into consideration as a potential cancerogens.

Acknowledgement: This study was supported by the K/ZDS/000783/2009, Poland

**WPŁYW KAPSAICYNY ORAZ SEZONOWOŚCI NA LCZEBNOŚĆ
WYDAWANEGO NA ŚWIAT POTOMSTWA U CHOMIKÓW
SYRYJSKICH (*Mesocricetus auratus*)**

Olimpia Przyjemska, Eugenia Tęgowska

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,
Zakład Toksykologii Zwierząt*

Kapsaicyna to jedna z najważniejszych substancji czynnych pieprzowca rocznego. Uczucie palenia i bólu związane ze spożywaniem i kontaktem z kapsaicyną wynika z jej bezpośredniego oddziaływania na neurony układu nerwowego, zwłaszcza na receptory czuciowe odpowiedzialne są za odczuwanie bólu oraz termoreceptory wrażliwe na bodźce termiczne. Efektem jej działania jest depolaryzacja synaps i wysyłanie sygnałów do mózgu, które odbierane są jako wrażenie ciepła i bólu. Kapsaicyna zazwyczaj nie powoduje trwałych uszkodzeń tkanek – pobudza tylko komórki nerwowe w podobny sposób, jak rzeczywiste uszkodzenia na skutek urazu mechanicznego, lub poparzenia.

Obiektem naszych doświadczeń jest wpływ kapsaicyny na gryzonia, między innymi chomiki syryjskie. Do tej pory wykazaliśmy, że podanie tego alkaloidu ma istotny wpływ na ich termoregulację a w szczególności na preferencje termiczne tych zwierząt i w związku z tym najprawdopodobniej także z innymi aspektami jak metabolizm czy rozrodczość. W przeprowadzonych do tej pory doświadczeniach udowodniliśmy że siła działania kapsaicyny powiązana jest ze zdolnością zwierząt do zapadania w hibernację lub torpor lub brakiem takiej zdolności.

Celem badań było sprawdzenie liczebności wydawanego wiosną na świat potomstwa w grupie kontrolnej składającej się z chomików, którym aplikowano w sezonie zimowym roztwór z solą fizjologiczną oraz chomików po 10ciokrotnej iniekcji roztworu z kapsaicyną w dawce 10mg/kg masy ciała . Iniekcje odbywały się podobnie jak w grupie kontrolnej, w sezonie zimowym i oddzielone były od siebie 24ro godziną przerwą. W każdej grupie znajdowało się 6 par w wieku prokreacyjnym.

Pilotażowe doświadczenia wykazały iż samice narażone na stres iniekcji kapsaicyny prędzej zachodziły w ciążę i wydawały na świat potomstwo niż samice z grupy kontrolnej, jednak w większości przypadków mioty samic z grupy kontrolnej były liczniejsze. Jednakże z racji iż ilość młodych w miocie i długość ciąży jest u gryzoni cechą dość indywidualną, należałoby przeprowadzić bardziej szczegółowe badania.

EFFECT OF EXPOSURE TO LOW DOSES OF PCB 153 ON THYROID HORMONES IN THE CEREBROSPINAL FLUID IN EWES

Skipor¹ J, Młynarczuk¹ J, Grochowalski A², Dufourny L³, Thiery J-C³

¹*Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland,* ²*Laboratory for Trace Organic Analyses of Krakow University of Technology, Poland,* ³*UMR 6175, Inra-Cnrs-Université F. Rabelais, 37380 Nouzilly, France*

Ortho-substituted polychlorinated biphenyls (PCBs) constitute a large part of the PCB residue found in the environment and animals tissues. Structure-activity relationship studies showed their binding activity to transthyretin (TTR), a protein acting as a major transporter of thyroid hormones (TH) in blood and cerebrospinal fluid (CSF). Binding of thyroxine (T4) to TTR in the CSF prevents its removal from the CSF as well as increase uptake of T4 into the brain. TH are involved in the endogenous seasonal rhythms of neuroendocrine reproductive activity in several photoperiodic species. Local conversion of T4 to biologically active triiodothyronine (T3) by deiodinase type II in the hypothalamus is a key process of that regulation. Disruption of TH transport and binding in the CSF is one potentially important mechanism by which PCBs can disturb TH homeostasis in the CSF. The present study aims to analyze the effect of *di-ortho* substituted PCB153 exposure on the concentrations of TH in the blood and CSF. For that purpose, we administered orally PCB 153 (0.33 mg/kg/day, 3 times per week during 3 week, i.e. 9 times, n=7) or vehicle in ovariectomized, estradiol treated ewes, and collected blood and CSF. We assayed PCB 153 levels (together with PCB138) and concentrations of T4 and T3. Mean (\pm SEM) concentrations of PCB 153 in plasma were 30 ± 8.6 pg/ml in control ewes, and 196 ± 54.7 pg/ml in PCB treated ewes. They reached 10.6 ± 1.1 pg/ml and 13 ± 0.7 pg/ml in the CSF, respectively. There were significant differences between PCB 153/138 ratio in control and PCB 153 treated ewes in plasma ($p < 0.005$) and CSF ($p < 0.02$). Exposure to PCB 153 significantly reduced the concentration of total T3 ($p < 0.05$) and free fraction of T3 ($p < 0.02$) in plasma, and the concentration of total T3 ($p < 0.02$) in the CSF. The levels of total and free T4 in plasma and CSF and free T3 in the CSF were not affected by PCB 153 administration. In conclusion, these results demonstrate that *di-ortho* PCB 153 reaches the CSF. Moreover, exposure to low doses of PCB 153 affects mainly T3, and this effect may be related with PCB action on deiodinase activity in both periphery and the brain.

Badania finansowane ze środków MNiSW (Projekt 258/N-INRA/2008/0) Grant n° DWM/N19/INRA/2008 France

VEGF mRNA EXPRESSION IN THE CHOROID PLEXUS OF EWES EXPOSED TO *ortho*-SUBSTITUTED PCB153

Szczepkowska¹ A, Skipor¹ J, Młynarczuk¹ J, Dufourny L², Thiery J-C²

¹*Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland,* ²*UMR 6175, Inra-Cnrs-Université F. Rabelais, 37380 Nouzilly, France*

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is involved in the regulation of endothelial cell stability, ependymal cell function, and periventricular permeability in adult. VEGF is required for the stability and maintenance of the choroid plexus and blockade of this molecule results in CNS damage. It has been demonstrated that *ortho*-substituted PCB 104 induce VEGF overexpression in endothelial cells that stimulates endothelial hyperpermeability and transendothelial migration of cancer cells. Most of the PCB congeners accumulated in the brain are *ortho*-substituted and non coplanar in nature.

The present study aims to analyze the effect of *ortho* substituted PCB153 exposure on the expression of VEGF in the choroid plexus. For that purpose, we administered orally 2,2',4,4',5,5' PCB (PCB153) (0.33 mg/kg/day, 3 times per week during 3 weeks, i.e. 9 times, n=7) or vehicle in ovariectomized, estradiol treated ewes. After killing animal, choroid plexuses were collected from lateral ventricles. Expression of VEGF in the ovine choroid plexus was evaluated using real-time PCR, and data were normalized on the basis of 18S mRNA content.

Real-time PCR analysis showed mRNA expression of VEGF in the choroid plexus but did not show any differences in the expression of VEGF in response to PCB 153 treatment. Further studies are necessary to evaluate VEGF protein abundance.

Badania finansowane ze środków MNiSW (Projekt 258/N-INRA/2008/0) Grant n° DWM/N19/INRA/2008 France

SEKRECJA PROSTAGLANDYN Z KOMÓREK NABŁONKA JAJOWODU KROWY, POD WPLYWEM POLICHLOROWANYCH BIFENYLI I ICH HYDROKSYLOWANYCH METABOLITÓW

Michał H. Wróbel, Jarosław Młynarczyk, Jan Kotwica

Institut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Polichlorowane bifenyle (PCBs) należą do grupy chloro-organicznych ksenobiotyków, trwałych, przemysłowych skażeń środowiska. Stymulują one sekrecję prostaglandyny (PG) F2 α z komórek macicy, zwiększając w ten sposób kurczliwość skrawków miometrium krowy. Ponieważ dla zapoczątkowania ciąży wymagane jest zachowanie prawidłowej kurczliwości jajowodu, warunkującej transport gamet i zarodka, dlatego celem niniejszych badań było określenie wpływu PCBs na sekrecję z komórek nabłonka jajowodu PGF2 α i PGE2, regulujących kurczliwość mięśniówki gładkiej.

Komórki nabłonka jajowodu krów z 1-5 dnia cyklu, inkubowano z PCBs: mieszaniną techniczną (Aroclor 1248), kongenerami (PCB 30 i PCB 153) oraz hydroksylovanymi metabolitami (PCB 30-OH i PCB 50-OH). Przeżywalność komórek pod wpływem PCBs (10 i 100 ng/ml) mierzono po 24, 48 i 72 h. Stężenie PGF2 α i PGE2 w medium hodowlanym określono po 2 i 48 h inkubacji z PCBs (0,1, 1 i 10 ng/ml).

Żaden z użytych PCBs nie zmienił ($P > 0.05$) przeżywalności badanych komórek. Podane PCBs zwiększały ($P < 0.05-0.01$) sekrecję PGF2 α i PGE2 z komórek nabłonka jajowodu, jednak po 48 h inkubacji ich wpływ na sekrecję PGE2 był mniej widoczny.

Podsumowując, PCBs zakłócają czynność sekrecyjną nabłonka jajowodu krowy, zmieniając stosunek wydzielanych prostaglandyn. Może to być częścią mechanizmu, na drodze którego PCBs wpływają na kurczliwość jajowodu krowy.

Praca finansowana przez projekt (N N311 006536) oraz Polską Akademię Nauk

Sesja 4

Adaptacje maczyno-płodowe w okresie ciąży

Przewodniczący:

Dr hab. Anna Chełmońska-Soyta

Prof. dr hab. Dariusz Skarżyński

AMPLICON LENGTH-POLYMORPHISM OF PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN FAMILY (PAG) IN THE DOMESTIC, WILD AND HYBRID PIGS*

Bieniek Martyna¹, Panasiewicz Grzegorz¹, Zalewski Kazimierz²; Koziarowski Marek³ and Szafranska Bozena¹©

¹*Department of Animal Physiology,* ²*Department of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;* ³*Department of Physiology and Reproduction of Animals, University of Rzeszow*

Multiple placental PAGs have been identified as complementary DNA (cDNA) cloned in the *Artiodactyla* (cattle, sheep, pig, goat and white-tail deer), *Perissodactyla* (horse and zebra), *Rodentia* (mouse) and *Carnivora* order (cat). The PAG gene family is expressed in embryo-originated membranes (pre-placental trophoblast and post-placental trophoctoderm – chorionic epithelium) of many eutherian mammals. The aim of this study was to identify amplicon-length polymorphism of porcine PAG genes (pPAG) in the domestic and wild pig genomes, comparing to a hybrid of the domestic pig with a wild boar (dp x wb) with the use of genomic DNA (gDNA), as templates. The gDNA was harvested from porcine leukocytes of females (n=31) and males (n=29) of the domestic pigs, and from hair roots of wild pigs (n=45) and dp x wb hybrids – *Sus scrofa domestica* x *Sus scrofa* (3 females and 4 males). The purified gDNA templates were applied for PCR amplifying the gene fragment (exons 6–9) with the lowest homology between active and inactive members. The primers (ex6SE/pagC) should allow to amplify the fragments (from 431 bp of cDNA and up to 2608 bp of gDNA), according to nine-exons of the pPAG2 gene structure. Obtained pPAG amplicons were electrophoresed parallel to pPAG10 cDNA – used as positive control, and negative control (without template), and then vacuum-transferred onto positively charged nylon membranes. The specificity of PCR-produced porcine PAG-like amplicons was examined by double ht-Southern hybridizations. Two [³²P]-labeled double stranded pPAG probes (complementary to ORF of cloned pPAG5 and pPAG10 cDNAs, as templates representing catalytically inactive and active aspartic proteinases (GenBank: AY188554 and AY775784, respectively). Autoradiography for the pPAG5 and pPAG10 probes permitted to identify different profiles and dominant pPAG amplicons of various length (up to approx. 2.6 kbp). The PAG amplicon profile determines diversified genotype of each animal. The profile of amplicon length-polymorphism of the pPAG genes may provide useful data for a novel genetic marker preparation.

*Supported by NR58/DR INNO/118/2008 and UWM522-0206.0206.
©szafran@uwm.edu.pl

THE EXPRESSION OF PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTORS (PPARs) GENES IN PORCINE ENDOMETRIUM DURING THE ESTROUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY

Iwona Bogacka¹, Dorota Boruszewska¹, Kamińska Katarzyna², Marek Bogacki²

¹*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Oczapowskiego 1A, Poland*

²*Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Science, 10-747 Olsztyn, Tuwima 10, Poland*

Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) are a family of the nuclear receptors which play an important role as transcriptional factors. Three isoforms of PPARs have been described PPAR α , PPAR γ , PPAR δ . Recently their role has been extensively explored in the rodent female reproductive system during the estrous cycle and pregnancy. The present study were undertaken to determine the quantitative expression of several isoforms of PPARs mRNA in the endometrium during the estrous cycle and periimplantation period in pigs. Gilts with an average body weight of 100 kg and 7 months of age from a private farm were divided into two groups, cyclic and pregnant. Gilts were synchronized and superovulated by single intramuscular injection of PMSG followed by hCG. The animals from the first group were slaughtered at following days of the estrous cycle: 2-4 (n=3), 5-8 (n=6), 9-10 (n=3), 11-12 (n=3), 13-15 (n=6), 16-17 (n=3) and 18-21 (n=6). Gilts from the second group were inseminated twice after treatment with PMSG and hCG (the first time 24 h after hCG treatment and the second time– 12 h later) and were slaughtered at a proper day of pregnancy to create following subgroups: 5-8 (n=6), 9-10 (n=6), 11-12 (n=7), 13-15 (n=7), 16-17 (n=5), 18-21 (n=3), 21-30 (n=3). The mRNA expression of PPARs in endometrium was analyzed by real-time RT-PCRs. During the estrous cycle the expression of PPAR γ 1 mRNA was significantly higher (p<0.01) on days 13-15 when compared to remaining periods. The expression of PPAR α and β transcripts showed similar pattern and the lowest levels of mRNAs were observed on days 2-4 (p<0.01), 16-17 and 18-21 (p<0.01) in comparison to remaining periods (days 5-8, 9-10, 11-12). During pregnancy significant increase (p<0.01) in the expression of PPAR γ 1 mRNA was noted on days 16-17, 18-21 and 22-30 when compared to earlier periods. The transcript level of PPAR β was significantly lower (p<0.05) on days 11-12 and 22-30 when compared to days 5-8, 9-10, 13-15. The mRNA expression of PPAR α was higher on days beginning from 5-8 till 18-21 and significantly (p<0.05) dropped on days 22-30. Significant decrease (p<0.05) in PPAR β mRNA level was also noted on days 9-10 when compared to days 5-8 and 11-12. The results indicate that the endometrial expression of PPARs genes fluctuate during the estrous cycle and gestation and it seems that the profile of changes depends on steroids (progesterone, estrogens) environment.

This research was supported by the Ministry of Science and Higher Education (Project N N311 360235)

**THE EFFECT OF IL1 β , IL6 AND TNF α ON MYOMETRIAL AND
ENDOMETRIAL EXPRESSION OF CYCLOOXYGENASE 2 (COX-2)
mRNA IN PIG (*SUS SCROFA DOMESTICA*) DURING PREGNANCY AND
THE ESTROUS CYCLE**

Anita Franczak¹, Agata Żmijewska¹, Beata Kurowicka¹, Bartosz Wojciechowicz¹,
Marek Bogacki², Genowefa Kotwica¹

¹*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
Oczapowskiego 1A, 10-718 Olsztyn*

²*Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences, Tuwima 10,
10-747 Olsztyn, Poland*

Porcine uterine tissues and embryos express cytokines, which can be involved in the regulation of prostaglandin secretion during early pregnancy and the estrous cycle. We examined if selected cytokines, IL1 β , IL6 and TNF α , regulate expression of COX-2 transcript gene in porcine myometrium and endometrium during days 10-11, 12-13 and 15-16 of pregnancy and the estrous cycle. Individual myometrial and endometrial slices harvested on respective days of pregnancy and the estrous cycle were placed in culture vials containing 2 ml medium M199, preincubated (18 h, 37°C, 95% O₂ and 5% CO₂) and next incubated for 12 h with control medium and cytokines: IL1 β , IL6 and TNF α (10 ng/ml, each). After incubation myometrial and endometrial slices were collected and the expression of COX-2 mRNA was determined using Real Time PCR method. On days 10-11 of pregnancy both the myometrium and endometrium responded positively to IL1 β . During the estrous cycle stimulatory effect of IL1 β was observed only in the endometrium. IL6 increased COX-2 mRNA expression only in pregnant myometrium, while TNF α increased abundance of COX-2 gene only in pregnant endometrium. On days 12-13 the myometrium did not respond to examined cytokines both during pregnancy and the estrous cycle. Endometrium harvested on days 12-13 of pregnancy responded positively only to IL1 β , while in the endometrium harvested on days 12-13 of the estrous cycle both IL1 β , IL6 and TNF α increased COX-2 mRNA expression. On days 15-16 of pregnancy the responsiveness of the myometrium to IL1 β , IL6 was higher when compared with pregnant endometrium. During days 15-16 of the estrous cycle only IL1 β increased COX-2 mRNA expression in the myometrium, while cyclic endometrium did not response to studied cytokines. In summary: 1) the effect of IL1 β , IL6 and TNF α on uterine abundance of mRNA for COX-2 depends on the day of the pregnancy and the estrous cycle; 2) among examined cytokines IL1 β seems to be the most potent regulator of COX-2 mRNA expression in porcine myometrium and endometrium.

This research was supported by grant N N311 0685 33 (2007-2010) from the Ministry of Science and Higher Education, Poland

PROFIL SEKRECJI LEUKOTRIENU (LT) B₄ I LTC₄ PODCZAS INDUKOWANEGO EKSPERYMENTALNIE STANU ZAPALNEGO MACICY U ŚWIŃ

Barbara Jana

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Celem badań było określenie profilu sekrecji LTB₄ i LTC₄ podczas indukowanego eksperymentalnie stanu zapalnego macicy u loszek. W 3 dniu cyklu rujowego (dzień 0 badań) do każdego rogu macicy infundowano w grupie kontrolnej (gr. I) 50 ml płynu fizjologicznego, a w grupach doświadczalnych 50 ml zawiesiny *E. coli* (025:K23/α:H1), zawierającej 10⁶ bakterii/ml (gr. II) lub 10⁹ bakterii/ml (gr. III). W dniu 0 oraz w kolejnych 17 dniach badań (do spodziewanego 20 dnia cyklu rujowego) pobierano od loszek próby krwi z żyły jarzmowej, w celu oznaczenia koncentracji LTs. W 17 dniu badań, przeprowadzono ocenę makroskopową jajników i macic oraz pobrano wycinki macic w celu oznaczenia zawartości LTs i wykonania oceny histopatologicznej. W macicach loszek gr. II stwierdzono rozwój ostrego procesu zapalnego o łagodnym przebiegu, podczas gdy w macicach loszek gr. III wykazano występowanie głównie ostrego procesu zapalnego o ciężkim przebiegu, a także podostrego. W grupie II, poziom LTB₄ w osoczu, w okresie od 6 do 10 dnia badań był wyższy (P<0.01, P<0.001) niż w gr. I. Infuzje bakterii w gr. III spowodowały, w porównaniu z gr. I, podwyższenie (P<0.01, P<0.001) koncentracji LTB₄ od 4 do 17 dnia doświadczenia. W okresie od 6 do 9 dnia badań poziom LTB₄ w osoczu loszek gr. III był wyższy (P<0.01) niż w gr. II. W porównaniu z gr. I, podanie niższej dawki bakterii wywołało zwiększenie (P<0.05-0.001) poziomu LTC₄ w osoczu od 4 do 12 dnia badań oraz w dniu 14 i 15, podczas gdy wyższa dawka *E. coli* spowodowała wzrost (P<0.05-0.001) koncentracji tego LT w okresie od 4 do 17 dnia badań. W 3, 8 i 11 dniu badań koncentracja LTC₄ w osoczu loszek gr. II była wyższa (P<0.05, P<0.01) niż w gr. III. Z kolei w gr. III w porównaniu z gr. II, ilość LTC₄ uległa podwyższeniu (P<0.05-0.001) w 5 i 9 dniu doświadczenia oraz w okresie od 13 do 17 dnia badań. Zawartość LTB₄ i LTC₄ w endometrium macic loszek gr. III była wyższa (P<0.05, P<0.01) niż w gr. I i II. Wyniki badań pokazują, że rozwijający się proces zapalny macicy o różnym nasileniu prowadził do wzrostu produkcji LTB₄ i LTBC₄. Jakkolwiek, wielkość i profil sekrecji obu LTs były zróżnicowane. Wielkość syntezy LTB₄ była bardziej uzależniona od stopnia nasilenia zmian zapalnych w macicach niż LTC₄.

LOKALIZACJA CZYNNIKA WZROSTU NERWÓW I JEGO RECEPTORÓW W MACICACH LOSZEK

Barbara Jana, Aneta Andronowska

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Czynnik wzrostu nerwów (NGF) odgrywa rolę nie tylko w funkcjonowaniu układu nerwowego, ale także układu endokrynowego i immunologicznego. Wcześniejsze badania własne pokazują, że lokalizacja, jak i nasilenie ekspresji NGF i jego receptorów (TrkA i p75 – o wysokim i niskim powinowactwie, odpowiednio) w jajnikach świń są zróżnicowane w przebiegu cyklu rujowego. Obecne badania miały na celu określenie, metodą immunocytochemiczną, lokalizacji NGF, TrkA i p75 w macicach pobranych od loszek w 11 oraz 19 dniu cyklu rujowego. Analiza mikroskopowa skrawków macic pochodzących z 11 i 19 dnia cyklu wykazała immunoreaktywność NGF i TrkA w nabłonku powierzchniowym i gruczołowym, śródbłonku i błonie mięśniowej naczyń krwionośnych, pojedynczych komórkach zrębu endometrium oraz w miometrium. W macicach z 19 dnia cyklu silniejszą reakcję NGF obserwowano w części komórek nabłonka powierzchniowego oraz śródbłonka naczyń krwionośnych w porównaniu z dniem 11. Z kolei, ekspresja TrkA w niektórych komórkach śródbłonka naczyń z 11 dnia cyklu była wyższa niż w dniu 19. Immunoreaktywność p75 w macicach pobranych w 11 i 19 dniu cyklu rujowego stwierdzono w części komórek nabłonka powierzchniowego i gruczołowego, śródbłonka naczyń krwionośnych, pojedynczych komórkach zrębu endometrium, a także w miometrium. Komórki błony mięśniowej naczyń krwionośnych nie dawały pozytywnej reakcji z użytym przeciwciałem. Intensywność reakcji barwnej p75 w niektórych komórkach śródbłonka naczyń w macicach z 11 dnia cyklu była wyższa niż w dniu 19 cyklu. Wykazana obecność NGF, TrkA i p75 w macicach świń sugeruje, że NGF działając przez swoje receptory uczestniczy w auto- i parakrynej regulacji funkcji macicy u tego gatunku zwierząt. Uzyskane wyniki wskazują także na możliwy wpływ hormonów steroidowych na ekspresję NGF, TrkA i p75 w macicy.

ROLA RECEPTORA KWASU LIZOFOSFATYDOWEGO 3 (LPA3) W BŁONIE ŚLUZOWEJ MACICY ŚWIŃ WE WCZESNYCH ETAPACH CIAŻY

Katarzyna Kamińska, Marta Wasielak, Marek Bogacki

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,
10-745 Olsztyn, ul. Tuwima 10*

U świń zbyt gęste zagęszczenie zarodków w macicy skutkuje zakłóceniami w procesie miogenezy i/lub zamieraniem zarodków, natomiast rodzące się prosięta w wyniku takiej ciąży charakteryzują się niższą masą urodzeniową, co przekłada się na ogromne straty w produkcji wieprzowiny i przemyśle mięsnym. Jednakże mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska u świń pozostają nieznane. Badania przeprowadzone na gryzoniach dowiodły, iż za nieprawidłowości w równomiernym rozmieszczeniu zarodków w macicy zwierząt wielorodnych może odpowiadać brak funkcjonalnego receptora kwasu lizofosfatydowego 3 (LPA3). Dlatego w niniejszej zbadano czy receptor LPA3 u świni, podobnie jak to wykazano u gryzoni, odgrywa również istotną rolę we wczesnych etapach ciąży ze szczególnym uwzględnieniem neuronalnego okresu okołoinplantacyjnego.

Przy wykorzystaniu metod Real-time RT-PCR oraz western blot określiliśmy poziom ekspresji genu oraz białka LPA3 w cyklu rujowym oraz we wczesnych etapach ciąży. Ponadto, do badań został również wykorzystany zwierzęcym modelem doświadczalnym, który stanowiły loszki poddane zabiegowi chirurgicznemu polegającemu na odcięciu jednego z rogów od trzonu macicy, w wyniku, czego po inseminacji do zapłodnienia dochodziło tylko w jednym rogu. W celu sprawdzenia powiązania funkcjonowania receptora LPA3 ze szlakiem syntezy prostaglandyn, zbadano wpływ selektywnego agonisty receptora LPA3 na wydzielanie prostaglandyn przez błonę śluzową macicy świń (RIA).

Analiza statystyczna wykazała wyższy poziom receptora LPA3 we wczesnych etapach ciąży w porównaniu do odpowiadających dni cyklu rujowego, 11-17 dzień ciąży, oraz w rogu macicy z rozwijającymi zarodkami. Wykazano również wpływ LPA3, między innymi, na podwyższenie wydzielania PGE2 przez błonę śluzową macicy świń.

Uzyskane wyniki potwierdzają znaczącą rolę LPA3 w okresie okołoinplantacyjnym i sugerują, iż receptor ten prawdopodobnie uczestniczy w równomiernym rozmieszczeniu zarodków oraz w inicjacji procesu implantacji u świń. Ponadto, receptor ten jest jednym z czynników biorących udział w modulacji poziomu prostaglandyn u ciężarnych loszek.

Katarzyna Kamińska jest współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

THE ESTROGEN RECEPTOR ALPHA (ER α) AND THE PROLIFERATIVE MARKER Ki-67 EXPRESSION IN THE UTERUS OF NEONATAL AND IMMATURE PIGS FOLLOWING EXPOSURE TO FLUTAMIDE

Katarzyna Knapczyk-Stwora¹, Małgorzata Durlej¹, Marek Koziorowski², Barbara Bilińska¹, Maria Słomczyńska¹

¹*Department of Endocrinology & Tissue Culture Institute of Zoology, Jagiellonian University, Kraków, Poland*

²*Department of Physiology & Reproduction of Animals, University of Rzeszów, Poland*

The uterus is a target tissue for many signaling molecules that govern its function through endocrine, paracrine and autocrine mechanisms. The normal uterine action requires a proper formation of endometrial glands. Endometrial adenogenesis, which begins shortly after birth is demonstrated by increasing epithelial cell proliferation as well as the estrogen receptor alpha (ER α) expression in nascent glandular epithelium and surrounding stroma.

Flutamide is well known as a potent androgen receptor (AR) antagonist. Recent findings showed that flutamide exerts its beneficial effects by up-regulation the ER α expression and enhancing local aromatase activity increasing plasma 17 β -estradiol (E2) level. Moreover, it was demonstrated that the proliferative response of the uterus to E2 can be blocked by an antiestrogen and an antiandrogen suggesting that androgens can also stimulate proliferation of the uterine epithelium. The objectives of this study were to determine whether the exposure to flutamide could be related to the changes in the presence of the ER α , as well as uterine cells proliferation in neonatal and immature pig uterus.

Porcine uterus were obtained from 2-day-old and 3-month-old animals exposed to flutamide (50mg/kg body weight) starting at 20 or 80 day of gestation or starting at *postnatal* day 2. The 5 μ m paraffin sections were incubated with a mouse monoclonal antibody against ER α at a dilution 1:100 and a mouse monoclonal antibody against Ki67 at a dilution 1:75 (both from Dako A/S, Glostrup, Denmark). Detection of the primary antibody was accomplished by the secondary antibody followed by the ABC/HRP complex, using horseradish peroxidase and DAB as a substrate.

Our data show the ER α expression in the endometrium and myometrium of neonatal and immature porcine uterus. The intensity of immunoreaction revealed noticeable changes in the expression of ER α after exposure to flutamide. Moreover the differences in the surface epithelium proliferation between flutamide-treated and control animals.

Concluding, the present data indicate that androgens acting through AR could be involved in the uterine cells proliferation as well as ER α expression.

EXPRESSION OF LYSOPHOSPHATIDIC ACID RECEPTORS DURING EARLY PREGNANCY AND ESTROUS CYCLE IN THE BOVINE CORPUS LUTEUM

Ilona Kowalczyk-Zieba, Katarzyna Jankowska, Dariusz Jan Skarzynski, Izabela Woclawek-Potocka

Department of Reproductive Immunology and Pathology, Institute of Animal Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, 10-747 Olsztyn, POLAND

We have recently shown that lysophosphatidic acid (LPA) stimulates prostaglandin (PG)E₂ and progesterone (P₄) secretion in vivo during the luteal phase of estrous cycle and during early pregnancy. Moreover, LPA acting as an auto-paracrine factor stimulates PGE₂ production by the bovine endometrial cells in vitro. LPA concentration and mRNA transcript expression for LPA receptor type 1 (LPA1) are higher in the bovine endometrium during early pregnancy in cows than during estrous cycle. However, there is no data confirming that LPA may act directly on bovine corpus luteum (CL) as a luteotropic factor. Therefore, the objective of the present study was to examine if bovine CL may be a target for LPA action during estrous cycle and early pregnancy. Before slaughter, cows were divided into two groups: pregnant and cyclic. The animals chosen for the pregnant group underwent artificial insemination. The tissues were assigned for the following days: days 2-4 of the cycle (n=6), days 8-10 of the cycle (n=7) and pregnancy (n=4), days 17-19 of the cycle (n=6) and pregnancy (n=10). Protein localization (immunohistochemical staining) and expression (Western blotting) as well as mRNA transcript quantification (Real-time PCR) of LPA receptors (LPA1, LPA2, LPA3, LPA4) in the bovine CL were evaluated. Proteins for all types of LPA receptors were found in the membranes of luteal cells and in some blood vessels during all examined phases of the cycle and early pregnancy. mRNA quantification and protein levels for all examined *LPA receptors* in the CL did not differ during the estrous cycle (P>0.05). However, on days 17-19 of pregnancy transcript abundance and protein levels for LPA2 and LPA4 were significantly higher than on the respective days of the estrous cycle and than on days 8-10 of pregnancy (P<0.05). In conclusion, the present study demonstrated dynamic expression of the LPA2 and LPA4 receptors in the bovine CL during the cycle and early pregnancy. The overall data suggest that the bovine CL may be a target for LPA action via LPA2 and LPA4 during early pregnancy, thus might contribute to the development and maintenance of the CL in cattle.

**DIVERSITY OF PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN
FAMILY (PAGS) IN THE IBERIAN RED DEER (*CERVUS ELAPHUS
HISPANICUS*)***

Panasiewicz Grzegorz¹, Kitewska Anna¹, Bieniek Martyna¹, Martinez-Pastor
Felipe² and Szafranska Bozena¹©

¹*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology, University of Warmia and
Mazury, 10-719 Olsztyn-Kortowo, Poland;* ²*National Wildlife Research Institute,
University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain*

A proper embryo-maternal interaction can be successfully examined by specific tests permitting for accurate concentration measurement of the PAGs (as prenatal protein markers) in the maternal blood or milk samples of the ruminant species. Such PAGs' tests are routinely used due to the commercial test BioPRYN® (BioTracking LLC, USA), based on two registered patents (USA/#6869770, Mexico/#233668). Both patents concern the catalytically inactive (I) and active (A) members of the PAG family that was classified to the aspartic proteinases (EC 3.4.23). Previously, complementary DNA (cDNA) of the chorionic PAGs have been cloned in some mammalian orders: *Artiodactyla*, *Perissodactyla*, *Rodentia* and *Carnivora*. But previously, genomic DNA (gDNA) has not been used as a template for amplicon-length polymorphism of the PAG genes. The aim of this study was to identify the PAG family polymorphism by different amplicon-profiles within two gene regions (exons 2–6 and 5–9) in the Iberian Red Deer (Ird), according to previously identified PAG cDNAs in the white-tailed deer and structural exon-intron organization of the PAG genes. This study was performed with gDNA of the Ird females and males (N=198). The gDNA templates were isolated from hair roots and used for two-step PCR. Agarose-separated Ird amplicons were transferred onto nylon membranes that were subjected to doubly heterologous (ht) Southern hybridization with ³²P-labeled porcine probes, complementary to pPAG3(I) and pPAG10(A) cDNAs (exons 2–9). This is the first study reporting the presence and amplicon-length polymorphism of the PAG gene family in the Iberian Red Deer, presently named **IrdPAG**. Our ht-Southern permitted to identify specific signals for the genes coding catalytically active and inactive forms of the IrdPAGs in this *Cervidae* subspecies. Higher IrdPAG amplicon polymorphism (173–3600 bp) occurred within the exons 2–6 (10 amplicons determining 14 genotypes) then within the exons 5–9, in which only 2 amplicons (390 and 610 bp determining 2 genotypes) were found. Further studies of the IrdPAG polymorphism are required for a novel genetic marker preparation that can be useful for early preselection of young females and males with the best reproductive abilities.

*UWM522.0206.206 grant; © szafran@uwm.edu.pl

EFFECT OF PITUITARY GROWTH HORMONE AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR TYPE-I ON PROLIFERATION, APOPTOSIS AND HORMONE SECRETION OF THE PLACENTAL CELL LINE JEG-3

Agnieszka Rak-Mardyła, Ewa Łucja Gregoraszcuk

Department of Physiology and Toxicology of Reproduction, Chair of Animal Physiology, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Kraków, Poland

Objective: Placenta human choriocarcinoma JEG-3 cells were used to study the possibility that pituitary growth hormone (GH) and insulin-like growth factor type I (IGF-I) act on first trimester of pregnancy progesterone (P4) and human chorionic gonadotropin (hCG) secretion, cell proliferation and apoptosis.

Material and Methods: The JEG-3 cell line was cultured in DMEM without phenol red containing 10% FBS. The cells were plated in 96-well plates at the density of 3×10^3 for 24 h and treated with 10, 50, 100, or 200 ng/ml of GH or 10, 30, 100, or 250 ng/ml of IGF-I for 24 h. At the end of the culture period, cell proliferation was measured using the BrdU colorimetric assay and caspase-3 activity, as a marker of apoptosis, was determined by the colorimetric method. Media were frozen for hormone analysis by enzyme immunoassay (EIA).

Results: We found that the stimulatory activities of GH and IGF-I on both P4 and hCG secretion paralleled the stimulation of cell proliferation and inhibition of apoptosis.

Conclusion: Our findings suggest an important role for pituitary GH and IGF-I in normal placental function during the first trimester of pregnancy.

OVARIAN STEROIDS REGULATE PROSTAGLANDIN SECRETION IN THE FELINE ENDOMETRIUM*

Marta J. Siemieniuch¹, Anom Bowolaksono², Dariusz J. Skarzynski¹ and Kiyoshi Okuda²

¹*Department of Reproductive Immunology and Pathology, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn, 10-747, Tuwima-St. 10, Poland*

²*Graduate School of Natural Science and Technology Okayama University, Tsushima Naka, 700-8530, Japan*

Prostaglandins (PGs) have been demonstrated to participate in majority of events in the reproductive tract and constitute potent factors controlling the endometrial function in several investigated species. Cyclical alterations of ovarian steroids seem to be responsible for fluctuations of PG levels throughout the menstrual and the estrous cycle. Sex steroids may directly affect spontaneous $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 production by the endometrium of the human, cow, pig, horse and rodent species. Sex steroids, i.e. progesterone (P_4) and 17β -estradiol (E_2), fluctuate during the feline estrous cycle and their alterations correspond to many events in the cat reproduction. To determine the endocrinal relationships in the feline endometrial cells, the methodology of the stromal and epithelial cells separation was established in the preliminary experiment. The homogeneity of the isolated cell cultures was confirmed by using an anti-cytokeratin and anti-vimentin staining. In primary cultures, the epithelial cells were spherical or cylindrical in shape, with distinct round nucleus, and stromal cells were spindle-shaped and elongated with slightly visible nucleus. The stromal cells contamination of epithelial cells did not exceed 5% and epithelial cell contamination of the stromal cells did not exceed 1%. To investigate possible effects of sex steroids on PG secretion in the cultured endometrial cells, mRNA expressions coding for PG-endoperoxide synthase (*PTGS2*) in the epithelial and stromal cells harvested with sex steroids were studied by RT-PCR. The effects of ovarian steroids on PG secretion in the epithelial and stromal cells were investigated by EIA. E_2 at a dose 10^{-7} M significantly increased $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion in the epithelial cells ($P < 0.01$). $\text{PGF}_{2\alpha}$ production was intensified by the treatment in combination with both steroids ($P < 0.001$). P_4 alone had no effect on $\text{PGF}_{2\alpha}$ secretion in the epithelial cells, whereas P_4 at a dose 10^{-5} M enhanced PGE_2 production ($P < 0.05$). The ovarian steroids stimulated both $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 in the epithelial cells of the feline endometrium via an E_2 receptor (ESR1)- and P_4 receptor (PGR)-dependent genomic pathway. In contrast to the epithelial cells, neither P_4 nor E_2 affected PG secretion in the stromal cells. *PTGS2* mRNA expression was not affected by ovarian steroids in both cell types. The presented scheme for the endometrial epithelial and stromal cells separation and culture system seems to be valuable as a research model for further studies in the function of feline endometrium. The overall results suggest that E_2 and P_4 are directly involved in PG secretion only in

the endometrial epithelial cells in the cat but these effects are not accompanied with changing *PTGS2* mRNA expression.

*Supported by Grant-in-Aid for Scientific Research from the Polish Ministry of Scientific Research and High Education (MNiSW N 308 031 934). MJS was supported by Domestic Grants for Young Scientists of the Foundation for Polish Science (FNP START, 2008, 2009) and Post Doctoral Fellowship Program of the Japan Society for the Promotion of Science (No. P 08733)

DISTRIBUTION AND CHANGES IN AMOUNTS OF THE AQUAPORIN 1, 5 AND 9 IN THE PIG UTERUS DURING THE ESTROUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY

Mariusz T. Skowronski¹ and Agnieszka Skowronska²

¹*Department of Animal Physiology, Faculty of Biology and* ²*Department of Human Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland*

Fluid movement through uterine cell membranes is crucial, as it can modulate the tissue imbibition pattern in the different phases of the estrous cycle. Moreover, during early pregnancy in the pig there is a dramatic reduction on luminal fluid which is associated with uterine receptivity for blastocyst implantation. Aquaporins (AQPs) are a family of membrane channel proteins that facilitate bulk water transport. To date, 11 isoforms of AQPs have been reported to be expressed in the female and male reproductive systems. The purpose of our study was to determine the localization and expression of AQP1, AQP5 and AQP9 within the pig uterus during different stages of the estrous cycle (days 2-4, 10-12, 14-16 and 18-20) and pregnancy (days 14-16 and 30-32). Immunoperoxidase and semi-quantitative immunoblotting techniques were used. The results demonstrated the following: (1) AQP1, AQP5, and AQP9 were clearly detected in all studied stages of the estrus cycle and pregnancy. (2) AQP1 was localized within uterine mesometrial, myometrial, and endometrial blood vessels. In cyclic gilts, endometrial and myometrial expression of AQP1 protein did not change significantly. In pregnant gilts, endometrial and myometrial expression of AQP1 protein increased on Days 14-16 and elevated on Days 30-32 in comparison with the estrous cycle. (3) AQP5 was localized in smooth muscle cells and luminal and glandular epithelial cells. Endometrial expression of AQP5 protein did not change significantly between Days 2-4 and 10-12 of the estrous cycle but increased ($P < 0.05$) on Days 14-16 and 18-20 when compared with Days 2-4 and 10-12 of the cycle. Myometrial expression of AQP5 did not change significantly during the estrous cycle, however increased in the pregnancy. (4) The anti-AQP9 antibody labeled luminal and glandular epithelial cells of uterus. Endometrial expression of AQP9 protein did not change significantly between Days 2-4 and 10-12 of the estrous cycle but increased ($P < 0.05$) on Days 14-16 and 18-20 when compared with Days 2-4 and 10-12 of the cycle. Thus, we can hypothesize that a functional and distinctive collaboration exists among diverse AQPs in water handling during the different functional uterine phases in the estrous cycle and pregnancy.

Praca finansowana przez MNiSW projekt badawczy N N308 0042 33

UDZIAŁ KOMPLEKSU BŁONOWEGO RECEPTORA PROGESTERONU (P4) W POZAGENOMOWYM MECHANIZMIE WPLYWU P4 NA MIOMETRIUM KROWY

Dominika Słonina, Magdalena K. Kowalik, Jan Kotwica

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

W pozagenomowym wpływie P4 na komórkę może uczestniczyć błonowy receptor P4 – PGRMC1 (progesterone membrane component 1), tworzący aktywny kompleks z białkiem SERBP1 (serpine 1 mRNA binding protein). Dotychczas stwierdzono obecność genu PGRMC1 w ciałku żółtym oraz w endometrium krowy. Jednocześnie wykazano, że P4 może działać pozagenomowo w komórkach miometrium, możliwe, że przez PGRMC1, jednakże brak jest danych na ten temat. Dlatego celem badań było określenie: (1) ekspresji genów PGRMC1 i SERBP1, oraz (2) komórkowej lokalizacji produktów tych genów w miometrium krów podczas cyklu rujowego.

Materiałem do badań były macice pobrane poubojowo od krów/i dojrzałych jałówek z 1-5, 6-10, 11-16, 17-21 dnia cyklu rujowego. W Dośw. 1 w homogenatach skrawków miometrium oznaczono ekspresję mRNA PGRMC1 oraz SERBP1 metodą Real-time PCR. W Dośw. 2 immunohistochemicznie lokalizowano białka PGRMC1 oraz SERBP1 w skrawkach macicy.

Wykazano po raz pierwszy ekspresję mRNA PGRMC1 oraz SERBP1 w miometrium krów. Nie obserwowano zmian ($P > 0.05$) w poziomie mRNA PGRMC1 w trakcie cyklu rujowego. Wykazano natomiast spadek ($P < 0.05$) ekspresji mRNA SERBP1 po 11 dniu cyklu. Barwienia immunohistochemiczne potwierdziły obecność białek PGRMC1 oraz SERBP1 w miometrium krów we wszystkich fazach cyklu rujowego.

Uzyskane dane wskazują na możliwą rolę receptora PGRMC1 oraz białka SERBP1 w pozagenomowym wpływie P4 na miometrium, co może dodatkowo służyć ochronie wczesnej ciąży, co sugerują wyniki wstępnych badań.

Praca finansowana w ramach grantu MNiSzW Nr NN311348237

THE LEVEL OF IMMUNOGLOBULIN IN THE MARE'S BLOOD AND MILK DURING THE POST DELIVERY PERIOD

Anna Świątek¹, Agata Zagrajczuk¹, Adam Okólski¹, Maria Kwaśniewska²

¹*Department of Animal Reproduction and Anatomy*

²*Department of Animal Physiology and Endocrinology*

Due to epitheliochorial type of placenta, the foal is bereft of mother's antibodies in a greater extent than the other domestic animals. Colostrum, as the main source of antibodies should include at least 30g of immunoglobulin in 1l. As the foal sucks the udder, the colostrums' ingredients change. The aim of the research was to evaluate the concentration of immunoglobulin in the blood plasma, colostrum and mare's milk, as well as evaluate the correlation between these factors and the state of reproductive tract. For the experiment 6 mares of konik polski breed had been used. The observations had been made from the day of delivery till the 12th day after delivery. During this period, the blood, colostrum and mare's milk had been collected to evaluate the level of immunoglobulin. The clinical, bacteriological and cytology examinations from the mare's reproductive system were carried out. The highest level of immunoglobulin in milk gland secretion was observed on the 1st day after delivery 3,304g/100 ml, the lowest 0,54g/100ml on the 12th day. The lowest level of immunoglobulin in the blood plasma 1,439g/100ml was observed on the 8th day after delivery and the highest 3,645g/100ml on the 10th day. The mares ovulated on the 7th, 8th and 9th day after foaling. With 66,6% of mares the microorganisms from the reproductive tract were isolated and in the 33,4% the result was negative. The most frequently isolated microorganism was Streptococcus sp. Among the separated pathogenic germs Streptococcus sp. from the C β- hemolytic group were isolated. On the basis of cytological examinations the infection was observed with one mare. Analyzing the results it was stated that the level of immunoglobulin in the blood plasma is higher than the level of immunoglobulin in the colostrum and mare's milk and the level of antibody during post partum period shows dropping down tendency. The average concentration of immunoglobulin in the blood plasma is 2,53g/100ml and in the secretion of the milk gland 1,61g/100ml. The increased level of antibody was noticed with the mares where the bacteriological infections of the reproductive tract were found. Statistical analysis of the results concerning the level of immunoglobulin in the blood plasma shows substantial differences among the examined mares.

EXPRESSION AND CELLULAR LOCALIZATION OF LYSOPHOSPHATIDIC ACID AND ITS RECEPTORS IN THE BOVINE ENDOMETRIAL CELLS

Izabela Woclawek-Potocka, Ilona Kowalczyk-Zieba, Katarzyna Jankowska,
Dariusz Jan Skarzynski.

*Department of Reproductive Immunology and Pathology, Institute of Animal
Reproduction and Food Research, Polish Academy of Sciences, 10-747 Olsztyn,
POLAND*

We have recently shown that lysophosphatidic acid (LPA) stimulates PGE₂ production, cell viability and intracellular calcium ion mobilization in cultured endometrial cells *in vitro*. However, there is no data which cells of the bovine endometrium are responsible for LPA production and what are the expression levels of *LPA1* receptor in these cells. The objective of the present study was to examine if cultured bovine epithelial and stromal cells were able to produce LPA and what were the expression levels of *LPA1* receptor in these cells. LPA concentration was measured in the culture medium and in stromal and epithelial cells of the bovine endometrium. Protein expression (Western blotting) as well as mRNA transcript quantification (Real-time PCR) of *LPA1* were evaluated in the cells. We found that both stromal and epithelial cells were able to produce LPA. However, in epithelial cells there was higher LPA concentration than in stromal cells. We also found higher mRNA and protein expressions for autotaxin (enzyme responsible for LPA synthesis) in epithelial than stromal cells. On the other hand, we demonstrated higher mRNA transcript abundance and protein expressions for *LPA1* in stromal than epithelial cells of the bovine endometrium. In conclusion, the present study demonstrated that LPA produced by epithelial cells acts as an auto-paracrine factor mainly on stromal cells of the bovine endometrium via *LPA1*.

**PRESENCE OF P450 AROMATASE (P450arom) AND PRODUCTION OF
17 β -ESTRADIOL (E₂) BY PORCINE ENDOMETRIUM AND
MYOMETRIUM DURING EARLY PREGNANCY AND THE ESTROUS
CYCLE (DAYS 14-16)**

Bartosz Wojciechowicz¹, Anita Franczak¹, Agata Źmijewska¹, Beata Kurowicka¹,
Barbara Jana², Anna Robak³, Genowefa Kotwica¹

¹*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
Oczapowskiego 1 A, 10-718 Olsztyn, bartosz.wojciechowicz@uwm.edu.pl*

²*Pathology of Reproduction Department, Division of Reproductive Endocrinology
and Pathophysiology, Institute of Animal Reproduction and Food Research,
Bydgoska 1/8, 10-243 Olsztyn*

³*Department of Comparative Anatomy, University of Warmia and Mazury in
Olsztyn, Plac Łódzki 3, 10-727 Olsztyn*

In all steroidogenic tissues, levels of E₂ depend mostly on activity of P450 aromatase, which is involved in final stages of its biosynthesis. Previously we described, that the porcine endometrium and myometrium may synthesize and secrete E₂ during both early pregnancy and the estrous cycle. In this study we examined if E₂ secretion levels are parallel with amount of P450arom in porcine endometrium and myometrium during early pregnancy and the estrous cycle. Slices of endometrium and myometrium were isolated from uteri of post pubertal pigs on days 14 - 16 of pregnancy and the estrous cycle. The isolated slices were pre-incubated in 2 ml of M199 medium for 18 hours in atmosphere of 95 % O₂ + 5 % CO₂ in 37 °C and then incubated for 6 hours. Concentration of E₂ in medium was determined with radioimmunoassay. Moreover, fragments of both tissues were used to establish the presence of P450arom with indirect immunofluorescence (using rabbit anti-rat cytochrome P450arom polyclonal antibody as primary and goat anti-rabbit IgG conjugated with biotin as secondary antibody). Cy3-conjugated streptavidin was used to visualize antibody complex. Preparations were examined under epifluorescent microscope. Pictures taken with magnification of 500 × and areas of fluorescence were determined with graphic software. The endometrium was richer than myometrium (p<0.05) source of E₂ during early pregnancy and also than the endometrium harvested during the estrous cycle. Those results correspond to the amounts of the P450arom, which were higher (p=0.05) in pregnant endometrium than in pregnant myometrium and cyclic endometrium (p<0.05). The myometrium during pregnancy secreted lower amounts (p<0.05) of E₂ than during the estrous cycle. The myometrium during the estrous cycle was also richer (p<0.05) source of E₂ than the endometrium. Those results provide another evidence of presence of the active steroid biosynthesis pathway in porcine uterus.

Research supported by grants: Ministry of Science and Higher Education N N311 0685 33 (2007-2010) and The European Union within The European Social Fund

THE INFLUENCE OF IL-1 β , TNF α AND IL-6 ON PGE₂ SYNTHESIS AND SECRETION BY CORPORA LUTEA OF PREGNANT PIGS

Agata Zmijewska, Anita Franczak, Beata Kurowicka, Bartosz Wojciechowicz,
Genowefa Kotwica

*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
Oczapowski 1A, 10-718 Olsztyn; e mail: agata.zmijewska@uwm.edu.pl*

One of luteotrophic mechanism in pregnant corpus luteum (CL) is local synthesis and secretion of luteotrophic prostaglandin E (PGE₂). This process may be regulated by paracrine factors – cytokines. Thus, we have determined the influence of cytokines on PGE₂ synthesis and secretion by porcine pregnant CL. Pubertal pigs (n=14) were used on days 10-11, 12-13 and 15-16 of the pregnancy. The isolated slices of CL (100 mg) were pre-incubated (18h) in 2 ml M199 medium in atmosphere of 95%O₂+5%CO₂ at 37⁰C. After preincubation the medium was changed to fresh one and slices were incubated by the next 6 or 12h with cytokines: interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin 6 (IL-6); (all in dose of 10 ng/ml). After each time of incubation the medium was collected and concentration of PGE₂ was measured with ELISA. The CL slices from 12h-lasted incubation were used for estimation of mRNA PGE₂ synthase (PGEs) expression (vs. housekeeping gene glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) with real-time PCR. The used cytokines had no influence on level PGEs mRNA during all studied days of pregnancy. Basal concentrations of PGE₂ in medium was the highest after 6h-lasted incubation of slices from 12-13 days of pregnancy (p<0.05). Interleukin 1 β increased (p<0.05) PGE₂ secretion from CL on days 10-11 of pregnancy after 6 and 12 h of cultures and after 6h-lasted incubation of CL on days 12-13 of pregnancy. PGE₂ production under influence of TNF α didn't change. IL-6 had slight effect on PGE₂ secretion by cultured porcine CL during 12-13 days of pregnancy. In conclusion IL-1 β had a luteotrophic influence on pregnant porcine CL by stimulation of PGE₂ secretion.

Supported by grant KBN N N311 0685 33 (2007-2010) and the European Union within the European Social Fund

Sesja 5

Andrologia molekularna – aspekty poznawcze i aplikacyjne

Przewodniczący:

Prof. dr hab. Barbara Bilińska

Prof. dr hab. Jerzy Strzeżek

ANALIZA PROTEOMICZNA EJAKULATÓW KNURA CHARAKTERYZUJĄCYCH SIĘ ZRÓŻNICOWANĄ PRZYDATNOŚCIĄ DO KRIOKONSERWACJI

Aleksandra Deszczka, Paweł Wysocki, Jerzy Strzeżek

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 10-718 Olsztyn-Kortowo, e-mail:
kbz@uwm.edu.pl.*

Dalszy postęp w technologii kriokonserwacji nasienia knura uwarunkowany jest, obok potrzeby doskonalenia procedury postępowania, poznaniem czynników molekularnych warunkujących różnicowanie osobnicze w zakresie przydatności nasienia do zamrażania. Celem badań była analiza zmian proteomu plemników i plazmy nasienia na wstępnych etapach technologii zamrażania nasienia metodą „kortowską” z możliwością ich wykorzystania do selekcji osobników produkujących ejakulatory przydatne do kriokonserwacji.

W badaniach wykorzystano ejakulatory pochodzące od 21 knurów inseminacyjnych. Próby nasienia świeżego (2 ml) wirowano przy 3000 obr/min przez 5 min. w temp. pokojowej. Supernatant wirowano ponownie przy 10 000 obr/min, a uzyskaną plazmę nasienia przeznaczano do dalszych analiz. Osad plemników przemywano dwukrotnie 0,85% NaCl, a następnie sporządzano ekstrakty plemnikowe z wykorzystaniem buforów z dodatkiem Triton X-100 lub SDS. Pozostałą część nasienia zamrażano metodą „kortowską”, przeprowadzając na etapie wstępnym dializę ejakulatu. Białka ekstraktów plemnikowych oraz plazmy nasienia rozdzielano elektroforetycznie. Immunodetekcji fosfoprotein tyrozynowych dokonywano z zastosowaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych. Wybrane polipeptydy analizowano metodą spektrometrii masowej.

Elektroforeza SDS-PAGE wykazała obecność białka o masie cząsteczkowej około 90 kDa w ekstraktach plemników pochodzących od knurów produkujących ejakulatory o niskiej przydatności do kriokonserwacji. Natomiast w proteomie plemników o wysokiej kriotolerancji nie wykazano obecności omawianego polipeptydu. Analiza spektrometryczna białka 90 kDa wskazała na jego podobieństwo do N-acetylo- β -heksozaminidazy oraz na lokalizację w strukturze białka domen fibronektynowych. Dializa ejakulatów knura powoduje przemieszczenie białka o masie cząsteczkowej około 70 kDa z plemników do plazmy nasienia. Omawiane białko wykazuje podobieństwo do albumin oraz spermadhezyn PSPI/PSPII. Białka plemników charakteryzujących się dobrą kriotolerancją wykazują niski poziom fosforylacji reszt tyrozynowych w nasieniu świeżym w porównaniu do ejakulatów o niskiej kriotolerancji.

Badania wykonano w ramach środków projektu badawczego rozwojowego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NR12001404.

SPRAWNOŚĆ SYNTEZY ATP W PLEMNIKACH KNURÓW INSEMINACYJNYCH JAKO TEST PRZYDATNOŚCI NASIENIA DO KRIOKONSERWACJI

Anna Dziekońska, Leyland Fraser, Jerzy Strzeżek

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 10-718 Olsztyn,
e-mail:kbz@uwm.edu.pl*

Celem badań było określenie wpływu dializy nasienia knura jako jednego z etapów postępowania technologicznego przed jego zamrażaniem (Fraser i in., *Theriogenology*, 67, 2007) na wybrane parametry oceny funkcjonalności mitochondriów plemników.

Analizy zmian zawartości ATP w plemnikach określano metodą bioluminescencyjną adoptowaną do plemników knura (Dziekońska i in., *J. Anim. Feed. Sci.*, 4, 2009). Integralność błon plazmatycznych w różnych regionach plemnika oceniano metodami fluorescencyjnymi z wykorzystaniem fluorochromów SYBR/PI i R123. Prezentowany zakres badań laboratoryjnych analizowano również w odniesieniu do wieku knurów i pory roku.

Stwierdzono, że dializa nasienia korzystnie wpływa na sprawność metaboliczną plemników knura. Zjawisko to przejawiało się wzrostem zawartości ATP w plemnikach i odsetka plemników z funkcjonalną strukturą mitochondrialną. Wykazano także statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) wzrost odsetka plemników z integralną plazmolemą (barwienie SYBR/PI). Analiza wariacji wieloczynnikowej (ANOVA) dowiodła, że obok etapu postępowania technologicznego (bez dializy, z dializą) wartości badanych parametrów uzależnione były od pory roku i wieku knura.

Otrzymane wyniki sugerują, że pomiar zawartości ATP może być przydatny w ocenie nasienia przeznaczonego do kriokonserwacji. Proces dializy może pozytywnie modulować właściwości biologiczne plemników knura. Pora roku i wiek knura mogą wpływać na proces syntezy ATP w plemnikach.

Badania wykonano w ramach środków projektu badawczego rozwojowego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NR 12001404/2008.

CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH PLEMNIKÓW KNURÓW INSEMINACYJNYCH W RÓŻNYCH ETAPACH TECHNOLOGII KRIOKONSERWACJI NASIENIA – MOŻLIWOŚĆ ZASTOSOWANIA PRAKTYCZNEGO

Leyland Fraser, Łukasz Zasiadczyk, Jerzy Strzeżek

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 10-718 Olsztyn-Kortowo;
e-mail: kbz@uwm.edu.pl*

Kriokonserwacja nasienia knura powodować może znaczne uszkodzenia plemników, które prowadzą do obniżenia ich zdolności zapładniającej.

W prezentowanych badaniach różne wyznaczniki właściwości biologicznych plemników zastosowano do identyfikacji knurów użytkowanych w SUL, których nasienie charakteryzuje się dobrą lub ograniczoną przydatnością do kriokonserwacji.

Ejakulatory kolekcjonowano od 24 knurów, które zgodnie z opisaną wcześniej technologią (Strzeżek i in. 1985, 2006) zamrażano w 10 ml tubach aluminiowych po zawieszeniu plemników w specjalnym rozcieńczalniku, zawierającym 5% liofilizowaną frakcję lipoprotein izolowaną z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo)*, 11% laktozę, 3% glicerol oraz 0,5% Equex STM. Obok mikroskopowej oceny ruchliwości plemników prowadzono analizy fluorescencyjne dotyczące integralności plazmolemy (SYBR-14/PI) i funkcjonalności struktury mitochondrialnej (R123/PI lub JC-1/PI). Ponadto określano osmotyczną oporność plazmolemy (test ORT) w regionie akrosomowym oraz jej podatność na indukowaną peroksydację lipidów (test TBARS). Na podstawie analiz jakości plemników po zamrożeniu-rozmrożeniu, wykorzystując programy statystyczne, wyodrębniono dwie grupy ejakulatów produkowanych przez knury. Ejakulatory pochodzące od knurów (n=11) zaliczanych do tzw. „dobrych zamrażaczy” (ang. ”good freezers”) charakteryzowały się szczególnymi właściwościami biologicznymi plemników po rozmrożeniu. Zjawisko to przejawiało się ich lepszą ruchliwością, wysoką integralnością plazmolemy, funkcjonalnością struktury mitochondrialnej oraz wyższą wartością wskaźnika ORT w porównaniu do ejakulatów produkowanych przez knury o ograniczonej możliwości ich kriokonserwacji (ang. ”poor freezers”). Dotyczyło to również podatności lipidów plazmolemy plemników na indukowaną peroksydację (LPO). Należy podkreślić, że ejakulatory pierwszej grupy knurów, bezpośrednio po pobraniu, charakteryzowały się również wysokim odsetkiem plemników z zachowaną integralnością plazmolemy, funkcjonalnymi mitochondriami oraz wyższą wartością ORT.

Uzyskane rezultaty badań podkreślają znaczenie praktyczne wybranych wyznaczników właściwości biologicznych plemników w selekcji knurów inseminacyjnych produkujących ejakulatory przydatne do kriokonserwacji.

* Zgłoszenie patentowe nr P 388264 do Urzędu Patentowego RP

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR STUDY ON HUMAN EJACULATED SPERMATOZOA INFECTED *IN VITRO* WITH SELECTIVE STRAINS OF BACTERIA

Monika Frączek¹, Małgorzata Piasecka², Dariusz Gączarzewicz³, Anna Szumała-Kąkol⁴, Anna Kazienko², Stanisław Lenard⁵, Maria Laszczyńska², Maciej Kurpisz¹

¹*Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań,*

²*Laboratory of Histology and Developmental Biology, Pomeranian Medical University, Szczecin,*

³*Department of Animal Reproduction, Westpomeranian University of Technology, Szczecin,*

⁴*Unit of Microbiology, Hospital Medical College, Poznań,*

⁵*Institute of Materials Engineering, Westpomeranian University of Technology, Szczecin, Poland*

The aim of the study was to examine an *in vitro* effect of the three representative bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* or *Bacteroides ureolyticus*) on ejaculated spermatozoa with reference to sperm membrane integrity and mitochondrial activity. Morphological and molecular studies were performed on swim-up-separated spermatozoa collected from 12 volunteers with normozoospermia. Sperm plasma membrane stability was checked by the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (SYBR14 and propidium iodide – PI) and by the merocyanine 540 (M540) test. Mitochondrial activity was evaluated using the JC-1 test and the NADH-dependent NBT assay (DT-diaphorase). Morphological examination of spermatozoa in a scanning electron microscope (SEM) has also been performed. Proportion of SYBR-14 positive cells was significantly lower while the percentage of PI positive cells was significantly higher in sperm treated with *B. ureolyticus* ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) as compared to control sperm. All the bacterial strains applied affected sperm plasma membrane architecture measured by M540 test ($p < 0.01$). Moreover, the presence of *E. coli* or *B. ureolyticus* was connected with significant decrease in both the number of cells with high mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) and the cells with normal oxidoreductive function of mitochondria ($p < 0.05$) as compared to untreated cells. Additionally, morphological alterations as irregular surface of acrosome, neck and midpiece as well as bacterial direct adhesion (or mediated by projections) to the surface of spermatozoa were found in SEM analysis. To conclude, the contact of bacteria with ejaculated sperm may initiate severe injury of sperm membranes and affect mitochondrial activity with potential consequences for male fertility.

CAN SILVER NANOPARTICLES INFLUENCE SEX STEROID HORMONES PLASMA CONCENTRATION IN RATS?

Joanna Gromadzka-Ostrowska¹, Michał Oczkowski¹, Katarzyna Dziendzikowska¹, Marcin Kruszewski², Maria Dusińska³, Gunnar Brunborg⁴

¹*Division of Nutrition Physiology, Department of Dietetics, Faculty of Human Nutrition and Consumer Science, Warsaw University of Life Science (SGGW), Warsaw, Poland*

²*Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warsaw, Poland*

³*Norwegian Institute for Air Research, Kjeller, Norway*

⁴*Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway*

The aim of the study was to check the silver nanoparticles effect on peripheral plasma concentration of sex steroid hormones in adult male Wistar rats.

The experiment was done on 70 rats, kept in individual plastic cages, under controlled environmental conditions with free access to the feed (Sniff B) and fresh water. The rats were divided into 10 experimental groups, 7 animals each. Seven rats were sacrificed at the beginning of experiment (group 0) and 63 rats obtained nanoparticles (NP) suspension by tail vein injections: 21 rats obtained silver 20 nm NP (AgI groups) and 21 rats obtained silver 200 nm NP (AgII groups), in both cases in dose 5 mg/kg body mass in 300 µl saline. 21 rats obtained 300 µl of physiological saline (NaCl groups). Initial body mass of rats did not differ between groups, growth curves in all groups also did not differ. 24 hours or 7 days or 28 days after injection rats from particular AgI, AgII and NaCl groups were bled from heart under isophlurane anesthesia. Plasma dihydrotestosterone (DHT) and 17β-estradiol (E2) concentration were measured by a method of radioimmunoassay using commercial kits (DSL and ALPCO Diagnostic respectively).

E2 was not changed significantly between all groups, whereas DHT was higher in NaCl than AgI and AgII groups (188,5±12 ng/ml, 147,9±11,09 and 120,1±11,4 ng/ml). Moreover, in NaCl groups DHT growing up from 150,2±4,7 ng/ml observed after 24 h after injection till 225,4±46,5 ng/ml 28 days after injection. In groups AgI and AgII 28 days after NP injection DHT significantly dropped from 127,4±13,3 to 83,5±10 ng/ml (AgI) and from 135,9±11,1 to 113,1±7 ng/ml (AgII).

The summary of the obtained results indicate that acute effects of silver nanoparticles, both 20 nm and 200 nm size, can disrupt synthesis and/or secretion of sex steroids hormones in male rats.

The study was supported by the Polish Norwegian Research Found – project no PNRF-122-AI-1/07

EXPRESSION OF CONNEXIN 43 IN THE PIG TESTES DURING NORMAL SPERMATOGENIC CYCLE AND FOLLOWING MATERNAL AND POSTNATAL EXPOSURE TO FLUTAMIDE.

Anna Hejmej, Iлона Kopera, Małgorzata Kotula-Balak and Barbara Bilińska

*Department of Endocrinology and Tissue Culture, Institute of Zoology,
Jagiellonian University, Krakow*

In order to better understand the function and mechanisms of gap junction protein regulation in the testis, connexin 43 (Cx43) expression was evaluated in control boars and those exposed to the nonsteroidal anti-androgen flutamide. Flutamide (50 mg/kg body weight) or vehicle injections were administered either to pregnant pigs on gestational days 20-28 and 80-88 or to neonatal piglets on postnatal days 2-10, every second day. Testes were isolated from sexually mature nine-month-old boars.

In control boar, immunohistochemical examination indicated that in various stages of the seminiferous epithelial cycle, Cx43 protein was localized predominantly between adjacent Sertoli cells at the blood-testis barrier and between Sertoli and germ cells at the apical ectoplasmic specializations. Cx43 signal was highest from stage VI to early stage VIII. Subsequent decline in the intensity of Cx43 staining observed at late stage VIII coincided with spermiation. Moreover, the immunoreactive protein was present in the interstitium between Leydig cells.

Histological examination of testes derived from flutamide exposed boars showed the presence of degenerating tubules with disorganized seminiferous epithelium and significant increase in Leydig cell volume.

RT-PCR analysis revealed the presence of Cx43 transcript in testes of flutamide-treated males and also in the control boars. On the other hand, both Western blot and immunohistochemical analyses revealed impaired expression of Cx43 protein in testes from all flutamide-treated individuals.

Taken together, our results indicate that Cx43 expression in the adult boar testis is dependent on the stage of the seminiferous epithelial cycle.

Experiments with flutamide suggest that androgen blockade during development alters testicular morphology and affects Cx43 gene expression at the protein level in later postnatal life.

OCENA WYBRANYCH PARAMETRÓW NASIENIA ORAZ POZIOMU HORMONÓW W NIE SELEKCYJONOWANEJ POPULACJI MŁODYCH MĘŻCZYŹN

Marzena Kamieniczna, Monika Frączek, Maciej Kurpisz

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Badania epidemiologiczne dotyczące niepłodności męskiej w Polsce nie mają długiej tradycji. Standardowa analiza nasienia nie dostarcza wprawdzie pełnej informacji koniecznej do określenia stanu płodności mężczyzny, ale stanowi najmniej inwazyjną procedurę pozwalającą wstępnie ocenić stan wydolności gonady męskiej. Aby wyznaczyć trend jakości nasienia w Polsce badaniami trzeba objąć nie tylko populację niepłodnych mężczyzn, zgłaszających się do poradni andrologicznych, ale również nie selekcyjonowaną populację młodych mężczyzn nie zgłaszających problemów prokreacyjnych lub oddalających chęć posiadania potomstwa w czasie. Systematyczne badania epidemiologiczne są prowadzone w Europie. Szereg badań wskazuje na niekwestionowany spadek parametrów nasienia w ciągu ostatnich 60 lat. W Polsce brak jest konkluzyjnych danych. **Celem pracy** była ocena wybranych parametrów nasienia oraz poziomu hormonów w nie selekcyjonowanej populacji młodych mężczyzn z regionu Wielkopolski i Lubelszczyzny. Badana grupa obejmowała 128 losowo wybranych mężczyzn w przedziale wiekowym od 20-35 lat. Próbkę ejakulatów pozyskiwano po 4 dobach abstynencji płciowej. Standardową ocenę seminologiczną wykonywano wg norm podanych przez WHO i ścisłych kryteriów Krügera dotyczących morfologii plemnika. Uczestnicy programu badawczego dostarczyli ankiety dotyczące ogólnego stanu zdrowia i potencjalnego wpływu czynników środowiskowych. Wszystkim uczestnikom badania oznaczono w surowicy krwi poziomy hormonów i czynników regulujących takich jak: FSH, LH, PRL, SHBG, T, estradiol, IGFBP-3, IGF-1, DHEA, DHEAS oraz inhibina B. Pomimo dużych indywidualnych (osobniczych) różnic nie zaobserwowano niepokojąco wysokiej liczby składowych badania seminologicznego o obniżonych parametrach w stosunku do norm WHO. Analiza hormonów wykazała liczne korelacje z poszczególnymi składowymi badania seminologicznego. Szczególnie istotne korelacje wykazano w przypadku prolaktyny i inhibiny B. Nasze badania zapoczątkowują program badań epidemiologicznych nie selekcyjonowanej populacji młodych mężczyzn w Polsce. Wyniki badań mogą być pomocne w wyznaczaniu polityki demograficznej państwa.

IS THE BLOOD-TESTIS BARRIER AFFECTED BY ADJUDIN?

Iłona Kopera¹, Linlin Su², Barbara Bilinska¹, C. Yan Cheng² and Dolores D. Mruk²

¹*Jagiellonian University, Department of Endocrinology and Tissue Culture,
Institute of Zoology, Krakow, Poland*

²*Population Council, Center for Biomedical Research, 1230 York Avenue, New
York, NY*

Recent studies have demonstrated that adjuvin [1-(2,4)-dichlorobenzyl-1*H*-indazole-3-carbohydrazide] perturbs cell adhesive function between Sertoli and germ cells, leading to the premature germ cells depletion from the seminiferous epithelium and reversible infertility in adult male rats. Cell adhesion in other organs, however, remained unaffected, indicating that the primary target of adjuvin is the testis-specific apical ectoplasmic specialization. The aim of this study was to determine the effect of adjuvin on Sertoli-germ cell adhesion in the testes of immature rats where the apical ectoplasmic specialization is absent and investigate the influence of this compound on the the blood-testis barrier. Histological analysis revealed that the formation of the tubule lumen and the developmental appearance of germ cells were delayed in adjuvin treated pups. Moreover, several proteins that build the blood-testis barrier were examined by immunoblotings and immunofluorescence microscopy. The results indicated that adjuvin affects the levels of blood-testis barrier constituent proteins as well as cellular localization of tight junction and basal ectoplasmic specialization proteins. To assess if these changes were related to the loss of the blood-testis barrier integrity the functional *in vivo* assay was performed. Diffusion of inulin-FITC to the adluminal compartment was detected in ~30 day old rats after adjuvin administration, suggesting that the blood-testis barrier was adversely affected. However, in older rats (~45 day of age) the blood-testis barrier function was not compromised. These data clearly illustrate that adjuvin affects, besides the apical ectoplasmic specialization, also the basal ectoplasmic specialization and tight junction proteins, resulting in delayed formation of the blood-testis barrier.

EFFECT OF PLATELET ACTIVATING FACTOR (PAF) ON MOTILITY AND PLASMALEMMA INTEGRITY OF CRYOPRESERVED CANINE SPERMATOZOA

Władysław Kordan, Marek Lecewicz, Rafał Strzeżek

*Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-718 Olsztyn-Kortowo,
e-mail: wladyslaw.kordan@uwm.edu.pl*

Platelet activating factor – PAF (1-0-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero3-phosphorylcholina) is implicated in a series of important functions in animal reproductive processes. It has been shown that the addition of 1×10^{-5} to 1×10^{-6} M PAF to cryopreserved boar semen had a positive effect on post-thaw sperm quality characteristics. There was no marked effect of PAF on sperm capacitation and the proportions of acrosome-reacted spermatozoa (Kordan *et. al.*, 2009).

The aim of this study was to determine the effect of PAF on motility parameters and plasmalemma integrity of cryopreserved canine spermatozoa. In this study 10 ejaculates were collected from 4 mixed-breed dogs. PAF, at concentrations ranging from 1×10^{-3} to 1×10^{-6} M, was added to different variants of the incubation mixtures prior to and after cryopreservation of semen. Sperm motility was analyzed using the CASA system (VideoTesT-Sperm 2.1, St. Petersburg, Russia). Sperm plasmalemma integrity was assessed using Hoechst 33258 fluorochrome and dual staining with SYBR-14 and propidium iodide (PI).

It was confirmed that the addition of PAF to cryopreserved semen, at concentrations ranging from 1×10^{-3} to 1×10^{-4} M, had a beneficial effect on the sperm quality characteristics. This effect was manifested in enhanced sperm motility and survival after cryopreservation. An increase in the percentage of linear motile spermatozoa was observed when PAF was used at higher concentrations. Furthermore, there was an increase in sperm plasmalemma integrity, assessed by Hoechst 33258 or SYBR-14/PI assay, when PAF was used at concentrations ranging from 1×10^{-3} to 1×10^{-4} M.

The results of this study emphasize the role of platelet activating factor in the reproductive processes. These findings also reaffirm the application of PAF as a supplement to cryopreserved dog semen so as to improve the post-thaw sperm quality characteristics.

Supported by research funds from UWM in Olsztyn (No. 0103.0206).

STATUS ANTYOKSYDACYJNY PLAZMY NASIENIA KNURA- CHARAKTERYSTYKA PRZED ZAMRAŻANIEM NASIENIA METODĄ „KORTOWSKĄ”

Magdalena Koziarowska-Gilun, Leyland Fraser, Jerzy Strzeżek.

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 10-718, Olsztyn; e-mail
kbz@uwm.edu.pl*

W zmodyfikowanej metodzie „kortowskiej” kriokonserwacji nasienia knura (Strzeżek i in. 1985; 2006) obok etapu „opłaszczania” plemników białkowymi komponentami plazmy nasienia stosowana jest procedura dializy określonej objętości ejakulatu przed następnymi etapami oziębiania i zamrażania prób w ciekłym azocie.

Celem badań było określenie zmian w składzie wybranych składników systemu antyoksydacyjnego plazmy nasienia knura poddanej procesowi dializy (Fraser i in. *Theriogenology*, 67, 2007).

W plazmie nasienia świeżego oraz uzyskanej po dializie, obok zawartości białka całkowitego i zawartości niskocząsteczkowego antyoksydantu L-glutationu (GSH+GSSG), oznaczano aktywności kluczowych enzymów antyoksydacyjnych (dysmutaza ponadtlenkowa-SOD; peroksydaza glutationowa-GPx i katalaza-CAT). Ponadto określano wartość całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS). Stwierdzono, że naruszenie relacji ilościowych niskocząsteczkowych składników plazmy nasienia po dializie ejakulatu korzystnie wpływa na jej analizowane właściwości biochemiczne. Zjawisko to przejawiało się wzrostem zawartości białka całkowitego i L-glutationu oraz aktywności właściwej SOD i GPx, przy jednoczesnym obniżeniu aktywności CAT. Omawiane zmiany sprzężone były ze wzrostem wartości TAS w plazmie nasienia knurów.

Oznacza to, że stosowanie wymienionego postępowania technologicznego przyczyniać się może do ograniczenia zróżnicowania osobniczego w zakresie jakości nasienia knura po zamrożeniu-rozmrożeniu.

Badania wykonano w ramach środków projektu badawczego rozwojowego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NR 12001404/2008

INFLUENCE OF DIETARY FAT LEVEL AND SOURCE ON 5 α -REDUCTASE TYPE 1 GENE EXPRESSION

Agata Krawczyńska¹, Joanna Gromadzka-Ostrowska¹, Alina Gajewska², Andrzej Herman²

¹*Division of Nutrition Physiology, Department of Dietetics, Faculty of Human Nutrition and Consumer Science, Warsaw University of Life Science (SGGW), Warsaw, Poland*

²*The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition Polish Academy of Sciences, Jabłonna, Poland*

5 α -reductase type 1 (5 α R1) is an enzyme responsible for testosterone metabolism into dihydrotestosterone in tissues such as liver, nongenital skin, brain, testis or ovary. Little is known about how nutrition modulates 5 α R1 gene expression. So the aim of this study was to investigate the effect of different dietary fat levels and types on 5 α -R1 gene expression in liver in male Wistar rats.

The experiment was conducted on 30 adult male rats (initial body weight 260 \pm 5g) which after one week of adaptation were fed diets with two levels of fat (5% and 21%) and three different fat sources: lard – L (rich in saturated and monounsaturated fatty acids SFA and MUFA respectively), grapeseed oil – G (rich in polyunsaturated fatty acids n-6, PUFA n-6) and flaxseed oil – F (rich in PUFA n-3) for 3 weeks. After 12 hours of food deprivation rats were anesthetized with izofluran and bled by cardiac puncture. Small fragments of liver (50-100mg) were immersed in RNALater (Sigma) and stored at -20°C until further analysis. Total RNA was extracted from samples with Trizol (Invitrogen) and additionally residues of DNA were digested with Dnase (Sigma). Reversed transcription and Real-Time PCR using Sybr Green assay were conducted according to manufacturer's protocol (Dynamo SYBR Green 2-step qRT-PCR, Finnzymes). The relative quantification with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as reference gene was carried out.

5 α R1 gene expression was statistically higher in groups fed high-fat diets than normo-fat diets (21% vs 5%, ANOVA, $p \leq 0,001$). Also an influence of a fat type was observed (ANOVA, $p \leq 0,038$) with the lowest level in group F (F vs S, $p \leq 0,027$). There was observed no interaction between fat level and fat type.

Positive correlation was observed between 5 α R1 gene expression and final body weight ($r=1$, $p=0,00$), fat consumption ($r=0,57$, $p \leq 0,0025$), SFA consumption ($r=0,73$, $p \leq 0,00002$) and MUFA consumption ($r=0,76$, $p \leq 0,00001$).

Summarize, results of our study indicate that 5 α R1 gene expression in rats liver were affected by level and type of fat in diet with the highest value in animals fed high-fat diet with lard as a dietary fat source. So it can be stated that manipulation with either amount or type of fat in diet affects metabolism of testosterone in liver on gene level.

The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education project No N N312 204735

WPLYW WYSOKIEJ TEMPERATURY W OKRESIE NEONATALNYM NA MORFOMETRYCZNE CECHY NAJADRZA SZCZURÓW

Beata Kurowicka, Monika Stępińska

*Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie, e-mail: Beata.kurowicka@uwm.edu.pl*

Celem przeprowadzonych doświadczeń było określenie wpływu wysokiej temperatury otoczenia na morfologię najądrzy szczurów w okresie przed- i po osiągnięciu dojrzałości płciowej. W badaniach porównano najądrza samców szczurów hodowanych od urodzenia do dojrzałości płciowej w otoczeniu o temperaturze 34°C (samce WR) z najądrzami samców hodowanych w otoczeniu o temperaturze 20°C (samce CR) i samców poddanych działaniu gorąca (34°C) po osiągnięciu dojrzałości płciowej (samce WA). Do oceny morfologicznej wykorzystano skrawki histologiczne najądrzy z siedmiu odcinków narządu, barwionych metodą P.A.S. Ocena morfometryczna wykazała, że: 1. Wysoka temperatura otoczenia nie wpłynęła znacząco na cechy morfometryczne najądrza w odcinku początkowym i środkowym głowy tego narządu w żadnej z badanych grup samców; 2. Obniżenie pola powierzchni przewodu najądrza, u samców WA, rejestrowano w odcinkach od trzonu do końca ogona najądrza. Towarzyszyło im zwiększenie wysokości nabłonka przewodu i zmniejszenie pola powierzchni światła przewodu; 3. W przekrojach przewodu najądrza samców WA, w odcinku początkowym i środkowym głowy, wystąpiły przekroje pozbawione plemników, a jednocześnie w grupie tej obserwowano najniższą powierzchnię plemników magazynowanych w ogonie najądrza. W grupie WR nie stwierdzono takiego efektu działania gorąca; 4. W grupie samców WR skutki działania wysokiej temperatury otoczenia dotyczyły jedynie tkanki śródmiąższowej najądrza, gdzie począwszy od końcowego odcinka głowy do środkowego odcinka ogona stwierdzono niższą gęstość komórek śródmiąższowych oraz obniżenie gęstości unaczynienia tkanki śródmiąższowej, szczególnie w początkowym odcinku głowy, trzonie i środkowym odcinku ogona.

Wnioski: Oddziaływanie gorąca na morfologię przewodu najądrza zachodzi odmiennie w zależności od tego, w jakim okresie życia samce szczurów zostały poddane jego działaniu, przy czym zaburzenia parametrów morfometrycznych najądrza są bardziej wyraźne u samców poddanych działaniu gorąca po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Wysoka temperatura otoczenia znacznie bardziej wpływa na morfologię ogona najądrza niż głowy narządu, co może wskazywać na upośledzenie zdolności do magazynowania nasienia w warunkach ekspozycji dojrzałych płciowo samców na wysoką temperaturę otoczenia.

Badania sfinansowano w ramach badań własnych 522.0206.0206 (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie)

THE EFFECT OF SEASON ON ANDROGEN RECEPTOR GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN TESTIS OF DOMESTIC GANDER

Anna Leska, Jacek Kieżun, Barbara Kamińska, Marek Opałka, Luiza Dusza

*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
10-718 Olsztyn-Kortowo, e-mail: anna.leska@uwm.edu.pl*

Androgens, gonadal steroid hormones, play a crucial role in the development, maintenance and regulation of male phenotype and reproductive physiology. Androgens exerts their multiple effects through intracellular androgen receptors (AR) which act as transcription factors. To our knowledge the AR mRNA seasonal expression was examined only in the testis of songbirds. The research on AR protein was limited to its testicular localization. The goal of our study was to investigate the AR gene and protein expression in testis of domestic ganders during the season. Domestic goose is characterized with the most definite seasonality in reproduction within farm poultry.

Testes of White Kółuda ganders were collected in the three characteristic phases of geese annual sexual behavior: the peak of reproductive activity (March), summer photorefractoriness (July) and fall sexual reactivation (November). The analysis of gene expression was conducted with the use of real-time PCR technique based on Sybr Green fluorescence emission. The relative quantification with GAPDH as reference gene was carried out. The AR protein expression was analyzed by immunohistochemistry based on indirect peroxidase system. The AR immunoreactive area was quantified separately for seminiferous tubules and for interstitial tissue with cell D Soft Imaging System (Olympus).

The analysis confirmed that AR gene and protein are expressed in domestic gander testis in all examined phases of annual reproductive cycle and that the expression is season-dependent. The low AR mRNA level during the breeding season was followed by increase in its content during the non-breeding stage and in the fall sexual reactivation. There was observed nuclear staining of AR protein in seminiferous tubules and interstitial tissue cells. In these both testis compartments there was low protein abundance in the non-breeding phase and high protein immunoreactivity during the two other phases.

Dynamic seasonal changes in the AR gene and protein expression are the evidence that AR is the factor which regulate androgen influence on gonad function.

This study was supported by Ministry of Science and Higher Education (project No N311 098034) and by the European Union within the European Social Fund.

VIMENTIN EXPRESSION IN TESTES OF STALLIONS WITH DISRUPTED SPERMATOGENESIS

Marta Łydka, Małgorzata Kotula-Balak, Barbara Bilińska

*Department of Endocrinology and Tissue Culture, Institute of Zoology,
Jagiellonian University, Krakow*

Vimentin-type intermediate filaments (IFs) form a delicate endocellular network, which is centered in the perinuclear region and extends to the apical region of the cell. The expression of IF proteins is genetically controlled and reflects the origin and state of differentiation of the cell. In testes, Sertoli cell vimentin filaments play an important role in the adaptation of Sertoli cells to the varying configurations of neighboring cells during spermatogenesis, whereas in Leydig cells vimentin filaments play a role in the regulation of steroidogenesis.

The objective of this study was to show whether localization and differential expression of vimentin are correlated with different grades of testicular malformations. The expression of vimentin gene at the protein level and its presence in testicular tissue was investigated by means of immunohistochemistry and Western blot, respectively.

The positive staining for vimentin was detected in testes from all stallions studied. However, the staining intensity and the distribution of the protein varied among particular tissue samples. In Sertoli cells of stallions with impaired spermatogenesis the intensity of staining for vimentin was weaker than that of the controls. The apical vimentin filaments collapsed towards the nuclei and were disorganized in the basal region of the cytoplasm. Moreover, different grades of vimentin disorganization in Sertoli cells were positively correlated with the severity of seminiferous epithelium abnormalities. In contrast, the staining intensity for vimentin in Leydig cells was clearly stronger than that of the controls.

In an immunoblot analysis of testicular homogenates vimentin appeared as a single band of approximately 57 kDa as did mouse liver homogenate used as a positive control. However, the relative protein level measured quantitatively was significantly lower in testes of stallions with disrupted spermatogenesis as compared to that of control individuals.

In conclusion, since vimentin disorganization in Sertoli cells correlated with seminiferous tubule impairment, it is possible that observed alterations may reflect a mechanism involved in regulation of a physiological support of germ cells by Sertoli cells.

**PORÓWNANIE ROZRZEDZALNIKÓW
MLEKOWO-ŻÓŁTKOWO-FRUKTOZOWEO I TRILADYL'U
DO MROŻENIA NASIENIA TRYKA W OKRESIE SKRACAJĄCEGO SIĘ
I WYDŁUŻAJĄCEGO DNIA**

Maciej Murawski i Marcin Partyka

*Katedra Hodowli Trzody Chlewnej i Małych Przeżuwaczy, Uniwersytet Rolniczy,
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

Celem pracy było porównywanie przydatności rozrzedzalników do kriokonserwacji nasienia tryka, których podstawowym składnikiem jest mleko, żółtko i fruktoza lub TRIS, a także określenie, który z nich lepiej chroni parametry biologiczne nasienia w procesie mrożenia w zależności od pory roku. Nasienie pobierano i poddawano kriokonserwacji od czterech tryków rasy olkuskiej jesienią i wiosną tj. w okresie skracającego się (SD) oraz wydłużającego dnia (LD). Od każdego tryka pozyskano po cztery ejakulatory w pierwszym i w drugim okresie badań. Łącznie pobrano 32 ejakulatory. Każdy ejakulat był rozdzielany na dwie równe części. Pierwszą część nasienia mrożono według procedury dwustopniowej rozrzedzalnikiem mlekowo-żółtkowo-fruktozowym, natomiast drugą rozrzedzano Triladyl'em i mrożono metodą jednostopniową. Po rozmrożeniu nasienia oceniano ruchliwość i przeżywalność oraz integralność błony plemnikowej metodą hypoosmotyczną (HOS). Otrzymane wyniki były analizowane przy pomocy pakietu statystycznego SAS z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji.

Ejakulatory pobrane w okresie SD charakteryzowały się wyższą ($p \leq 0,05$) średnią objętością (2,00 ml) od ejakulatów pobranych w okresie LD (1,73 ml). Najwyższą ($p \leq 0,01$) koncentrację plemników obserwowano w ejakulatach pochodzących z okresu SD - 3,55 mld/ml, najniższą - 2,70 mld/ml obserwowano w LD. Najwyższy ($p \leq 0,01$) odsetek plemników poruszających się ruchem postępowym po rozmrożeniu 69,47% obserwowano w SD, a najniższy 44,29% w okresie LD. Plemniki po rozmrożeniu najdłużej 370,00 minut przeżywały w nasieniu z okresu SD a najkrócej 176,20 minut w okresie LD ($p < 0,01$). Procent plemników z nieuszkodzoną błoną komórkową ($p \leq 0,01$) ocenianych testem HOS był najwyższy 75,84% w nasieniu mrożonym jesienią, a najniższy 55,11% w nasieniu wiosennym. Zarówno w okresie SD jak i LD nasienie rozrzedzane Triladyl'em charakteryzowało się wyższym ($p \leq 0,05$) odsetkiem plemników z nieuszkodzoną błoną. Podsumowując, rozrzedzalnik Triadyl charakteryzował się lepszymi właściwościami kriochronnymi plemników tryka w porównaniu z mlekowo-żółtkowo-fruktozowym zarówno w okresie SD jak i LD.

WPŁYW SPOŻYCIA PIWA NA WYBRANE PARAMETRY HORMONALNEJ REGULACJI DOJRZEWANIA PŁCIOWEGO SZCZURÓW.

Michał Oczkowski¹, Aleksandra Kołota¹, Wanda Dyr³, Wojciech Kostowski³,
Marta Ćwiek³, Ewa Wolińska-Witort² i Joanna Gromadzka-Ostrowska¹

¹ Zakład Fizjologii Żywienia, Katedra Dietetyki, Wydział Nauk o Żywieniu
Człowieka i Konsumpcji, SGGW w Warszawie;

² Zakład Neuroendokrynologii Klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia
Podyplomowego w Warszawie

³ Zakład farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego, Instytut Psychiatrii i
Neurologii w Warszawie

Alkohol oddziałuje na układ endokryny poprzez modyfikację syntezy, sekrecji i transportu hormonów. Szczególnie istotne są zmiany wywołane spożywaniem alkoholu przez młode osobniki oraz jego wpływ na regulację procesów rozrodczych w tej grupie populacji.

Celem doświadczenia było określenie zależności między spożyciem piwa a poziomem wybranych hormonów regulujących dojrzewanie płciowe szczurów.

Badanie zostało przeprowadzone na 26 młodych samcach rasy WHP (*Warsaw High Preferring*), które od 30. dnia życia otrzymywały piwo o 10%-wej zawartości alkoholu przez 2 i 4 tygodnie (P2, n=6; P4, n=7). Zwierzęta pijące piwo miały również swobodny dostęp do wody, natomiast zwierzęta z grup kontrolnych (K2, n=7; K4, n=7) otrzymywały do picia *ad libitum* tylko wodę. Wszystkim zwierzętom podawano również *ad libitum* paszę Labofeed H. Po 2 i 4 tygodniach trwania doświadczenia w głębokiej narkozie chirurgicznej od wszystkich zwierząt pobrano krwi z serca.

Metodą radioimmunologiczną oznaczono stężenie hormonu luteinizującego (LH), folikulotropowego (FSH) oraz testosteronu w osoczu krwi.

Analiza statystyczna wyników nie wykazała istotnych różnic w stężeniu FSH w grupach zwierząt pijących piwo w porównaniu z grupami kontrolnymi. Stwierdzono natomiast istotnie wyższe stężenia LH w grupach kontrolnych szczurów w stosunku do grup doświadczalnych (P2 vs K2, p=0,0015 oraz P4 vs K4, p=0,0052) oraz istotnie wyższe stężenie testosteronu w grupie K2 w stosunku do grupy P2 (p=0,0011).

Zaobserwowano istotnie wyższe wartości FSH w grupie P2 względem grupy P4 (p=0,0038) oraz grupy K2 względem grupy K4 (p=0,0017), a także istotnie wyższy poziom LH oraz testosteronu w grupie K2 względem grupy K4 (odpowiednio p=0,0023 oraz p=0,0062).

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że spożywanie piwa może mieć wpływ na zmianę parametrów hormonalnych układu rozrodczego młodych szczurów.

Badania były finansowane z projektu MNiSW nr N N312 158334

**ANALIZA PRZEBIEGU MEJOZY NA KOMÓRKACH
POCHODZĄCYCH Z EJAKULATU U NOSICIELA TRANSLOKACJI
CHROMOSOMOWEJ WZAJEMNEJ T(9;13)(P10;P11) O
POTWIERDZONEJ AZOOSPERMII**

Marta Olszewska¹, Ewa Wiland¹, Nataliya Huleyuk², Maciej Kurpisz¹

¹ Instytut Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, Polska;

² Institut of Hereditary Pathology of Academy of Medical Sciences, Ukraine,
79000, Lviv, Lysenko Str. 31a

Występowanie translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW) u niepłodnych mężczyzn wynosi około 1%. W profazie podczas pachytenu pomiędzy chromosomami homologicznymi dochodzi do koniugacji. Chromosomy zaangażowane w TCW formują strukturę kwadriwalentu, którego zachowanie wpływa na odsetek różnych typów nie zrównoważonych genetycznie gamet. Koniugacja chromosomów może zostać zaburzona przez regiony otaczające punkty pęknięć chromosomów. Powstają niesparowane odcinki chromosomów autosomalnych, które mogą ulegać koniugacji z chromosomami X i Y, które podczas spermatogenezy są skondensowane i nieaktywne transkrypcyjnie. Asocjacja pomiędzy nieaktywnym bivalentem XY a kwadriwalentem może być przyczyną zaburzeń mejozy, co prowadzi do zatrzymania spermatogenezy i tym samym niepłodności. U większości nosicieli TCW parametry ejakulatu są w normie, natomiast występowanie oligo- lub azoospermii dotyczy TCW związanych z chromosomami X i Y, chromosomami akrocentrycznymi oraz z translokacjami, w których chromosomy mają punkty pęknięć w centromerze.

U nosiciela TCW t(9;13)(p10;p11) podjęto badania zmierzające do wyjaśnienia przyczyn jego niepłodności. Okazało się, że nosiciel ma azoospermie, co jest charakterystyczne dla translokacji zawierających chromosom 13 oraz punkty pęknięć w centromerze. W ejakulacie nosiciela zidentyfikowano komórki gametogeniczne na różnych etapach spermatogenezy w ilościach sugerujących znaczne złuszczenie nabłonka do światła nasieniowodów. Celem analizy była ocena profazy I podziału mejotycznego oraz ustalenie etapu, na którym doszło do bloku spermatogenezy. Wykonano serię doświadczeń z zastosowaniem metody FISH (fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami centromerowymi, subtelomerowymi oraz malującymi całe chromosomy). Zidentyfikowano kwadriwalent chromosomów 9 i 13 w stadium pachytenu profazy I podziału mejotycznego oraz wykryto, że ma miejsce koniugacja z chromosomami X i Y. Wykazano, że do bloku spermatogenezy dochodzi w pachytenie profazy I podziału mejotycznego. Znakując centromery chromosomów X i Y określono odsetek komórek zawierających bivalenty XY w kompleksie z kwadriwalentem 9/13 (79%), odsetek komórek zawierających chromosomy X i Y nieskoniugowane (14%) oraz odsetek komórek zawierających tylko jeden z chromosomów płci (po 3% dla X i Y). Uzyskane wyniki oraz dane literaturowe pozwalają na powiązanie występowania TCW (w tym punktów pęknięć chromosomów) z zaburzeniami przebiegu mejozy. Można również stwierdzić, że utworzenie kompleksu

kwadriwalentu chromosomów 9 i 13 z biwalentem XY jest powodem zatrzymania spermatogenezy u nosiciela TCW t(9;13)(p10;p11), a tym samym stanowi przyczynę azoospermii.

ENDOCRINE MANIFESTATION OF SEASONAL QUALITY OF STALLION'S SEMEN

Krystyna Pierzchała-Koziec¹, Joanna Zubeł¹, Ewa Ocioń¹, Kazimierz Kosiniak-Kamysz²

¹*Department of Animal Physiology and Endocrinology, ²Department of Horse Breeding, University of Agriculture, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, e-mail: rzkoziec@cyf-kr.edu.pl*

Seminal plasma has a composition of different substances supporting sperm cells and some substances affecting function of the reproductive system and spermatozoa. Previous experiments showed that opioid peptides and ghrelin are present in stallion's blood and semen. However, in spite of many experiments still is lack of easy, repeatable estimated factors of stallions reproductive ability. This is very important not only from the vet point of view but also for the prediction of fertilization ability.

Therefore, as a part of study dealing with the stallion's reproduction problems the experiment was taken out in order to proof the presence of ghrelin, opioids, their receptors, insulin-like growth factor (IGF-1) and steroids in the semen.

Experiment was carried out on 30 stallions from 3 studs. Semens were taken from April to May (spring probes), and from July to September (summer probes). After analysis of semen quality by motility, sperm concentration and morphology, stallions were divided into two groups –A with very good quality semen and B with lower quality semen in each season.

Seminal plasma was directed to the estimation of ghrelin and its receptor by Western Blot method, opioids were estimated by own radioimmunological method, steroid hormones were measured by commercial RIA kits. Semen's profile of peptides profile was revealed by electrophoresis.

The results showed the presence of ghrelin and specific ghrelin receptor in the semen from both groups of stallions. However, good quality semen had much more of ghrelin and its receptor than that found in semen from B group stallions. These results are in agreement with higher opioid concentration estimated by radioimmunoassay and changes with its receptor. Also, they were seasonal differences in the semen concentration of opioids, IGF-1 and steroids. Interestingly, the electrophoresis of semen peptides showed that independently from season an additional peptide in lower quality semen was present.

Thus, the results suggest that changes of all tested hormones are connected with the season and quality of semen. Ghrelin is one of the hormones involved into the metabolism of semen as well as opioids, which have diminishing effect on the enzymes activity in semen. It seems probable, that these hormones might be use as the factors of semen quality in stallions.

Supported by grant given by Ministry of Science and Higher Education No:R1202102 and University Grant No:BW-2223 KFZ/09

OCENA REZYSTENCJI BŁON PLAZMATYCZNYCH PLEMNIKÓW OGIERA W MIKROSKOPIE FLUORESCENCYJNYM BARWIONYCH FLUOROCHROMEM HOECHST 33258

Zenon Podstawski, Kazimierz Kosiniak-Kamysz, Monika Święch

*Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Katedra
Hodowli Koni, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

W ocenie integralności błon komórkowych stosowane są różne barwniki fluorescencyjne kwasów nukleinowych mające zdolność przenikania przez uszkodzone błony. Badania Januskauską i in. (2001) wykazały, iż zastosowanie barwnika Hoechst 33258 pozwala na określenie liczby plemników żywych w ejakulacie buhaja, stwierdzając jednocześnie, że procent plemników uszkodzonych istotnie ujemnie koreluje z odsetkiem plemników żywych ocenianych metodą tradycyjną w mikroskopie świetlnym. Także Huo i in. (2002), wykazali że metoda ta pozwala na efektywną ocenę jakości nasienia knura podczas jego przechowywania *in vitro*. W oparciu o powyższe podjęto badania nad określeniem możliwości wykorzystania oceny uszkodzeń błon plemnika w mikroskopie fluorescencyjnym w diagnostyce jakości nasienia ogiera.

Ocenię poddano 42 ejakulatory pochodzące od 28 ogierów w wieku od 3 - 15 lat należących do 5 ras. Preparaty morfologiczne do oceny przygotowano według metodyki opracowanej w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie, a następnie w mikroskopie fluorescencyjnym w zakresie światła ultrafioletowego (346 - 460nm) dokonano oceny 500 plemników.

Przeprowadzone badania wykazały, iż odsetek plemników uszkodzonych czyli wykazujących fluorescencję w tych preparatach wahał się od 10 – 63%. Porównując odsetki plemników świecących ze wskaźnikami oceny jakości nasienia nie stwierdzono jakichkolwiek zależności między ocenianymi parametrami. Natomiast, zależności takie wystąpiły, między liczbą plemników nieuszkodzonych w ejakulacie, wyliczonych z całkowitej liczby plemników oraz odsetka plemników uszkodzonych. Istotne korelacje dodatnie tych plemników zarejestrowano z całkowitą koncentracją plemników ($r = 0,64$) i koncentracją plemników o ruchu postępowym ($r = 0,76$) oraz z ruchem ogólnym i ruchem postępowym plemników przy $r = 0,28$). Dokonując analizy liczby plemników nieuszkodzonych w 42 ejakulatach stwierdzono, że w 23 spośród nich liczba tych plemników przekraczała $6,0 \times 10^9$ ($\bar{x} = 13,9 \times 10^9$), w których liczba plemników o ruchu postępowym wynosiła $> 3,5 \times 10^9$ ($\bar{x} = 9,0 \times 10^9$) natomiast w 19 ejakulatach liczba plemników nieuszkodzonych była niższa od $6,0 \times 10^9$ ($\bar{x} = 3,9 \times 10^9$), a liczba plemników o ruchu postępowym $< 3,5 \times 10^9$ ($\bar{x} = 1,7 \times 10^9$)

**ZASTOSOWANIE LIOFILIZOWANEJ FRAKCJI LIPOPROTEIN
IZOLOWANYCH Z ŻÓŁTKA JAJA STRUSIA AFRYKAŃSKIEGO
(*STRUTHIO CAMELUS*)* DO KONSERWACJI NASIENIA PSA W
TEMPERATURZE +4°C**

R.Strzeżek, E.Stachurska

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn,*

Celem badań była ocena zmian wybranych cech biologicznych plemników psa, poddanych procesowi konserwacji w stanie płynnym w temperaturze +4°C przez okres 4 dni, z zastosowaniem rozcieńczalnika Tris – cytrynian – fruktoza (TCF) z dodatkiem (1%, 5%, 10%) liofilizowanej frakcji LPFo. Materiał do badań stanowiła frakcja plemnikowa pochodząca z ejakulatów pozyskanych od 5 psów mieszańców w wieku od 1,5 do 8 lat.

Na podstawie przeprowadzonych badań mikroskopowych, fluorescencyjnych i biochemicznych stwierdzono, że rozcieńczalnik TCF zawierający różne warianty dodatku LPFo wywiera ochronny wpływ na zachowanie cech biologicznych plemników dotyczących ruchliwości, integralności plazmolemy (barwienie fluorescencyjne CFDA/PI), funkcjonalności struktury mitochondriów (barwienie fluorescencyjne R123/PI), statusu energetycznego (zawartość ATP) podczas konserwacji w temperaturze +4°C. Pomimo braku wystąpienia statystycznie istotnych różnic (pomiędzy wariantami dodatku LPFo do rozcieńczalnika) wykazano, że najbardziej optymalne działanie ochronne odnośnie badanych wyznaczników występuje w przypadku 5% dodatku LPFo. W zakresie wszystkich analizowanych właściwości biologicznych plemników stwierdzono występowanie znacznej zmienności osobniczej. Przeprowadzone analizy zdają się potwierdzać, że dodatek LPFo do rozcieńczalnika TCF korzystnie wpływa na właściwości biologiczne plemników psa konserwowanych w temp. + 4°C.

* Zgłoszenie patentowe nr P 3882464 do Urzędu Patentowego RP.
Praca wykonana w ramach badań własnych UWM nr. 0103.0206

KINETYKA RUCHU PLEMNİKÓW KNURA JAKO KRYTERIUM W OCENIE PRZYDATNOŚCI NASIENIA DO KRIOKONSERWACJI

R.Strzeżek, L.Fraser, J.Strzeżek

*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn,*

Celem badań była określenie możliwości wykorzystania pomiarów kinetycznych ruchu plemników do oceny wpływu dializy nasienia knura na właściwości biologiczne plemników przed ich zamrażaniem. Materiał do badań stanowiły ejakulatory pochodzące od 24 knurów użytkowanych w SUL. Próby nasienia poddawano dializie według postępowania opisanego wcześniej (Fraser i wsp., *Theriogenology* 2007, 67). Do oceny parametrów ruchliwości wykorzystano mikroskop kontrastowo-fazowy (Nikon Optiphot-2, Tokio, Japonia) wraz z komorą zliczającą (Makler chamber, Sefi Medical Instruments, Haifa, Izrael) oraz system CASA (Video Test Sperm 2.1, St. Petersburg, Rosja).

Analiza (przeprowadzona porównawczo dla nasienia świeżego i poddanego dializie; z / bez stymulacji roztworem kofeiny) obejmowała określenie odsetka plemników ruchliwych oraz identyfikacji typów ruchu plemników (klasa A – ruch szybki prostoliniowy i postępowy, B – ruch powolny prostoliniowy i postępowy, C - ruch nieprostoliniowy, cyrkulacyjny, D – plemniki nieruchliwe). Dokonywano również pomiarów właściwości kinetyki ruchu plemników określanych wg WHO odpowiednimi skrótami (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF).

W próbach nasienia poddanych dializie stwierdzono istotny wzrost odsetka plemników ruchliwych (z / bez stymulacji roztworem kofeiny), wzrost populacji plemników wykazujących ruch prostoliniowy i postępowy (klasa A i B), obniżenie liczebności populacji plemników nieruchliwych (klasa D). W zakresie parametrów kinetyki ruchu plemników obserwowano wzrost wartości wskaźników VCL, VSL, VAP.

Przeprowadzona analiza parametrów ruchliwości, w tym także kinetyki plemników, wskazuje, że etap dializy nasienia knura przed zamrażaniem zwiększa populację komórek charakteryzujących się wysoką aktywnością aparatu ruchu.

Badania wykonano w ramach środków projektu badawczego rozwojowego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju NR 12001404/2008.

**IMMUNOEKSPRESJA RECEPTORA FSH W KOMÓRKACH
NABŁONKOWYCH NAJĄDRZA MĘŻCZYŹN I SZCZURA ORAZ
WPŁYW FSH NA MORFOLOGIĘ I AKTYWNOŚĆ STEROIDOGENNĄ
KOMÓREK NABŁONKOWYCH NAJĄDRZA SZCZURA W
WARUNKACH *IN VITRO***

¹Małgorzata Świder-Al-Amawi, ¹Agnieszka Kolasa, ¹Mariola Marchlewicz.,
²Irena Baranowska-Bosiacka, ³Andrzej Sikorski, ¹Barbara Wiszniewska

¹*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii PAM w Szczecinie*

²*Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka PAM w Szczecinie*

³*Katedra i Klinika Urologii PAM w Szczecinie*

Funkcję regulacyjną w najądrzu pełnią androgeny. Funkcja ta pozostaje również pod kontrolą estrogenów, hormonów, których sekrecja w jądrze pozostaje pod kontrolą LH i FSH. Można zatem spodziewać się podobnej regulacji syntezy tych hormonów w najądrzu. Jak wykazały badania, w tym własne, komórki nabłonkowe najądrza *in vivo* i *in vitro* wykazują ekspresję LH-R, co wskazuje na najądrze jako narząd docelowy dla tej gonadotropiny. Wykazana niedawno obecność receptorów FSH w ogonie najądrza szczurów i małp wskazuje, że również FSH pełni funkcję regulacyjną wobec najądrza. Stąd celem badań było potwierdzenie ekspresji FSH-R w najądrzu mężczyzn i szczurów oraz sprawdzenie ewentualnego wpływu FSH na morfologię hodowanych komórek nabłonkowych najądrza szczurów i syntezę 17 β -estradiolu (E2). Immunoekspresję FSH-R określano w skrawkach najądrzy mężczyzn i szczurów szczepu Wistar. W celu określenia wpływu FSH na morfologię i syntezę E2, komórki nabłonkowe najądrza hodowano w pożywce z/bez DHT oraz z dodatkiem FSH w stężeniu 0,4 i 0,8 IU/mL pożywki. Immunoekspresję FSH-R wykazano w przewodzikach odprowadzających oraz głowie, trzonie i ogonie najądrza zarówno mężczyzn, jak i szczurów. W nabłonku przewodzików odprowadzających pozytywną reakcję odnotowano w komórkach urzęsionych oraz nieurzęsionych. W nabłonku najądrza natomiast najintensywniejszą reakcję wykazywały komórki główne głowy najądrza, podczas gdy intensywność odczynu zmniejszała się w kierunku ogona. Wykazano także stymulujący wpływ FSH na morfologię hodowanych komórek nabłonkowych najądrza oraz ich funkcję, czego efektem był wzrost stężenia E2 w medium hodowlanym.

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH ORAZ STĘŻENIE CYNKU I MIEDZI W PLAZMIE NASIENIA WYBRANYCH RAS KNURÓW

Jan Udała, Tomasz Stankiewicz, Barbara Błaszczuk, Dariusz Gączarzewicz,
Alicja Hendzel, Katarzyna Wojciechowska

*Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie*

W pracy określono aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GSH-Px) oraz stężenie cynku i miedzi w plazmie nasienia knurów rasy polskiej białej zwistouchej (pbz, n=20), wielkiej białej polskiej (wbp, n=8) oraz linii hypor (n=22). Uzyskane nasienie poddano ocenie makro- i mikroskopowej. Aktywność (SOD) i (GSH-Px) określano za pomocą zestawów Ransod-Ransel firmy Random, a zawartość Zn i Cu wykonano metodą kolorymetryczną przy użyciu zestawów firmy Quimica Clinica Aplicada.

Objętość ejakulatu u knurów rasy pbz i wbp oraz linii hypor wynosiła odpowiednio $296,0 \pm 65,2 \text{ cm}^3$, $292,5 \pm 95,6 \text{ cm}^3$, $271,8 \pm 98,4 \text{ cm}^3$, koncentracja plemników osiągnęła wartość $316,5 \pm 45,3 \times 10^6/\text{cm}^3$, $333,8 \pm 63,5 \times 10^6/\text{cm}^3$ i $316,1 \pm 96,8 \times 10^6/\text{cm}^3$, a ruch postępowy plemników u tych ras kształtował się na poziomie $78,0 \pm 4,1\%$, $76,3 \pm 5,2\%$ i $71,8 \pm 10,5\%$.

Aktywność GSH-Px u knurów rasy pbz, wbp i linii hypor wynosiła odpowiednio $210,6 \pm 93,5 \text{ U/I}$, $228,2 \pm 140,1 \text{ U/I}$ i $422,7 \pm 189,7 \text{ U/I}$ natomiast aktywność SOD kształtowała się na poziomie $76,6 \pm 12,6 \text{ U/I}$ u knurów rasy pbz, $67,0 \pm 19,6 \text{ U/I}$ u knurów rasy wbp oraz $76,3 \pm 12,8 \text{ U/I}$ u knurów linii hypor. Istotne różnice odnotowano w aktywności GSH-Px pomiędzy knurami linii hypor a knurami rasy pbz i wbp. Najwyższe stężenie cynku odnotowano w nasieniu knurów linii hypor ($600,8 \pm 284,0 \mu\text{mol/dl}$), a najniższą koncentracją tego pierwiastka charakteryzowało się nasienie knurów rasy pbz ($437,8 \pm 186,2 \mu\text{mol/dl}$). W nasieniu knurów rasy wbp stężenie Zn wynosiło $479,8 \pm 200,7 \mu\text{mol/dl}$. Najwyższą koncentracją Cu odznaczało się nasienie knurów wbp ($38,5 \pm 21,7 \mu\text{mol/dl}$), nieco niższą nasienie knurów pbz ($35,2 \pm 14,9 \mu\text{mol/dl}$), a najniższą nasienie knurów linii hypor ($31,6 \pm 15,4 \mu\text{mol/dl}$). Zarówno w stężeniu cynku jak i miedzi nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy badanymi knurami.

Stwierdzona najwyższa aktywność GSH-Px jak również najwyższe stężenie Zn u knurów linii hypor wskazują, iż genotyp może być czynnikiem istotnie różnicującym właściwości biochemiczne nasienia, a tym samym wpływającym na jego właściwości biologiczne, co powinno być uwzględniane w praktyce inseminacyjnej.

USE OF FLUORESCENT PROBES AND HYPOOSMOTIC SWELLING (HOS) TEST TO ASSESS PLASMA MEMBRANE INTEGRITY OF FROZEN-THAWED BOAR SPERMATOZOA

Łukasz Zasiadczyk, Anna Dziekońska, Leyland Fraser, Władysław Kordan

Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-718 Olsztyn-Kortowo, e-mail: fraser@uwm.edu.pl

The sperm plasma membrane integrity is involved in metabolic exchanges with the surrounding medium and plays an important role in several fertilization related events. Differences in the sperm cryotolerance between individual boars might be one of the sources of variability that could affect the fertilizing ability of frozen-thawed spermatozoa.

In this study, a battery of assays was used to assess the structural and functional integrity of the sperm plasma membrane following freezing-thawing of the whole ejaculates (WEs) and sperm-rich fractions (SRFs) of boar semen. The WEs or SRFs, collected from Polish Large White boars, were frozen using a standard semen cryopreservation protocol (Strzeżek et al. *Med Vet* 1985, 41:349-353). Besides sperm motility evaluations, plasma membrane integrity (PMI) assessments were monitored using different fluorescent probes: SYBR-14; propidium iodide (PI); and carboxyfluorescein diacetate (CFDA). The hypoosmotic swelling test (HOS) was used to assess the functional integrity of the sperm tail membrane, whereas JC-1 was used to assess the mitochondrial membrane potential. Cryopreservation compromised sperm PMI, as indicated in a significant decline in SYBR-stained cells or CFDA-stained cells, irrespective of the ejaculate collection procedure. There were consistent differences in post-thaw sperm PMI among boars. ANOVA results showed that boar variability had a significant effect on post-thaw sperm PMI measured either by SYBR-14/PI assay or CFDA/PI assay. In each boar, post-thaw sperm motility was positively correlated with the proportions of JC-1 stained spermatozoa in either the WEs or SRFs. Furthermore, the percentage of spermatozoa with functional plasma membrane (HOS-positive sperm cells) varied among boars and was correlated with both membrane integrity assays after freezing-thawing. These findings indicate that the susceptibility of spermatozoa to cryoinjury might be related to differences in their membrane properties. It seems that the use of different fluorescent probes, in combination with the HOS test, could improve the reliability of the sperm membrane integrity assays in the assessments of post-thawed boar semen quality.

Supported by research funds from UWM in Olsztyn (No. 0103.0206).

Sesja 6

Lokalne regulacje funkcji jajnika u ssaków i niższych kręgowców

Przewodniczący:

Prof. dr hab. Jadwiga Przała

Prof. dr hab. Janusz Rząsa

THE INFLUENCE OF ANTI-ANDROGEN FLUTAMIDE ON THE EXPRESSION OF THE ANDROGEN RECEPTOR IN THE PORCINE OVARY – IN VIVO AND IN VITRO STUDIES

M. Duda¹, M. Durlej¹, K. Knapczyk-Stwora¹, M. Koziorowski², M. Słomczyńska¹

¹*Department of Endocrinology & Tissue Culture, Institute of Zoology, Jagiellonian University, Kraków, Poland.*

²*Department of Physiology & Reproduction of Animals, University of Rzeszów, Poland.*

Androgens play a crucial role in female reproductive physiology through influencing growth and development of ovarian follicles. They appear to act in two distinct ways, directly influencing androgen- dependent gene expression, and indirectly as a substrate of estrogen synthesis. Androgens mediate their action via the androgen receptor (AR), a member of the nuclear receptor superfamily, which acts as a ligand- regulated transcription factor. The purpose of the present research was to test the role of AR in mediation the action of androgens on the porcine ovarian development following the anti-androgen flutamide administration.

To test the influence of flutamide on ovarian development *in vivo*, sows were injected starting at 20 or 80 day of pregnancy (50 mg/kg body weight) five times, every second day. Thereafter, ovaries were obtained from adult cycling pigs. Immunohistochemistry was performed on tissue sections using the polyclonal rabbit IgG anti-AR (dilution 1:2000, SantaCruz). Immunohistochemical reaction revealed that AR protein has nuclear localization either in granulosa cells or theca cells of the antral follicles from mature pig follicles. There were significant differences in the intensity of immunoreaction for that antigen between investigated groups of animals.

Equally, the *in vitro* experiments were undertaken. Granulosa cells isolated from mature pig follicles were cultured in the presence of testosterone, 2-hydroxyflutamide or both testosterone and 2- hydroksoflutamide. All cultures were incubated for 48 hours and cells were processed for androgen receptor immunocytochemical staining, Western- Blott of AR and EIA analyses of estradiol and progesterone synthesis. Addition of 2- hydroksoflutamide in the presence of testosterone had a positive effect on AR expression in porcine granulosa cells, and the most effective stimulation the estradiol synthesis was observed. 2- hydroksoflutamide also influences an androgen receptor distribution, and changes its localization from nuclear to perinuclear in the cytoplasm.

Concluding, our results suggest that androgens acting through ARs could be involved in control of AR expression in porcine ovaries either *in vivo* or *in vitro*.

Supported by grant N N303 017737

CONNEXIN 43 GAP JUNCTION mRNA AND PROTEIN EXPRESSION IN THE OVARY OF MATURE PIG AFTER EXPOSURE TO FLUTAMIDE

Małgorzata Durlej¹, Katarzyna Knapczyk-Stwora¹, Ilona Kopera¹, Marek Kozirowski², Barbara Bilińska¹, Maria Słomczyńska¹

¹*Department of Endocrinology & Tissue Culture Institute of Zoology, Jagiellonian University, Kraków, Poland*

²*Department of Physiology & Reproduction of Animals, University of Rzeszów, Poland*

Gap junctions have a role both in maintaining tissue homeostasis and in the exchange of regulatory molecules involved in normal cellular growth and development. Communication among granulosa cells, theca cells, between granulosa cells and cumulus cells, and between granulosa cells and oocytes is essential for successful follicular growth and development, oocyte maturation and ovulation. Connexin 43 (Cx43) is one of the predominant gap junction proteins in the ovary, enabling proper interactions within the follicle. The purpose of the present research was to test the role of androgens acting via androgen receptors (AR) on gap junctional communication using ovaries of mature pigs exposed to an anti-androgen, flutamide.

To test the influence of anti-androgen on Cx43 gene expression in porcine ovaries, pregnant sows were injected with flutamide (50 mg/kg body weight, five times, every second day) starting at 20 or 80 day of gestation. Moreover the same doses of flutamide was administered to newborn piglets starting at *postnatal* day 2. Thereafter, ovaries were obtained from nine-month-old pigs exhibited at least two estrous cycles. Immunohistochemistry was performed on tissue sections using a polyclonal rabbit antibody against Cx43 (dilution 1:2000; Sigma Aldrich) followed by a goat anti-rabbit IgG (dilution 1:300; Vector Lab.) and the standard ABC method. Binding of antibody to the antigen was visualized by diaminobenzidine. Western blot analysis was performed using the same antibody. Afterwards, to show Cx43 mRNA in the pig ovaries RT-PCR was carried out.

Immunohistochemical reaction revealed that Cx43 protein in the antral follicles of cycling pigs was localized on granulosa cells membranes. Moreover, theca cells of these follicles showed a positive staining, but apart from the region close to the lamina basalis. Our data showed the differences in the Cx43 expression between mature control and flutamide-treated pigs.

Based on our preliminary results we suggest that androgens acting through ARs could be involved in control of Cx43 expression in the ovarian follicles of adult pigs.

This work was supported by a grant N N303 33983

**IMMUNOEKSPRESJA ENZYMÓW STREOIDOGENNYCH I POZIOM
STEROIDÓW W JAJNIKACH STARYCH SAMIC NORNICY RUDEJ
(*Clethrionomys glareolus S.*): WPŁYW FOTOPERIODU**

Jerzy Galas, Maria Szółtys, Katarzyna Knapczyk-Stwora, Weronika Fober

*Zakład Endokrynologii i Hodowli Tkanek Katedry Fizjologii Zwierząt
Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Ingardena 6., 30-060 Kraków, e-mail:
jerzy.galas@uj.edu.pl*

Nornice należą do zwierząt o sezonowym, zależnym od fotoperiodu rozrodzie. Długi dzień stymuluje funkcję jajników, podczas gdy krótki dzień ją hamuje. Zmiany wywołane procesem starzenia się dotyczą różnych aspektów rozrodu, w tym funkcji jajników, w których wyczerpuje się pula pęcherzyków jajnikowych, a owulacje ustają. Celem przeprowadzonych badań było ustalenie wpływu fotoperiodu na morfologię, immunoekspresję enzymów steroidogennych i zawartość steroidów w jajnikach starych, 2-letnich nornic. Jajniki nornic hodowanych w długim fotoperiodzie zawierały typowe pęcherzyki jajnikowe i ciała żółte, jednakże znaczną część jajnika wypełniały niezorganizowane w pęcherzyki jajnikowe komórki podobne do komórek ziarnistych i komórki przypominające komórki interstycjalne. Pozytywną reakcję na obecność dehydrogenazy hydroksysteroidowej (3β -HSD) obserwowano w osłonce wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych, komórkach interstycjalnych, w ciałkach żółtych i w opisanej powyżej nietypowej części jajnika. Immunoekspresja cytochromu P450c17 obecna była głównie w osłonce wewnętrznej, komórkach interstycjalnych, nielicznych komórkach ciała żółtego i niektórych komórkach nietypowej części jajnika. U nornic krótkiego dnia prawie cały jajnik wypełniały niezorganizowane w struktury jajnika komórki, bogato przerośnięte tkanką tłuszczową, a pęcherzyki obecne były tylko sporadycznie. Immunoekspresję 3β -HSD obserwowano w większości komórek jajnika, jednakże była ona najsilniejsza w wyspach dużych komórek otoczonych tkanką tłuszczową. Komórki te wykazywały również najsilniejszą immunoekspresję cytochromu P450c17. Radioimmunologiczna analiza steroidów w homogenatach jajników wykazała, że dominującym hormonem w jajnikach nornic długiego dnia był progesteron, a krótkiego dnia androgeny.

Badania finansowane z DS/770-K/ZDS/000781

FAS/FAS LIGAND SYSTEM INVOLVEMENT IN EQUINE CORPUS LUTEUM FUNCTIONAL REGRESSION

Galvão A^{1,2}; Ramilo D¹; Skarzynski DJ²; Lukasik K²; Mateus L¹, Ferreira-Dias G¹

¹C.I.I.S.A., Faculty of Veterinary Medicine, Technical University, Lisbon, Portugal; ²Department of Reproductive Immunology and Pathology, Institute of Animal Reproduction and Food Research of PAS, Olsztyn, Poland.

Luteolysis is essential for the resumption of ovarian cyclicity when pregnancy has not been established yet. In the mare, a cyclic coordinated vascular and non-vascular corpus luteum (CL) regression involves active caspase-3 mediated apoptosis. The luteolytic process requires the action of a number of triggering factors, such as hormones and cytokines. As a result, progesterone (P₄) production impairment (functional luteolysis) and changes in luteal tissue morphology via apoptosis (structural luteolysis), occur during CL regression. A common pathway triggering apoptosis results in cytokine receptors activation, including tumor necrosis factor super family receptors (TNFRs). Studies on other species suggest an important role for FasL/Fas system on structural involution and luteolysis. Nevertheless, knowledge on the influence of FasL on steroidogenic capacity is lacking. Thus, the aim of the present study was to evaluate (i) the presence of the cytokine FasL and its receptor Fas in the mare's CL throughout the luteal phase; as well as (ii) the influence of FasL alone, or together with the cytokines TNF α and interferon gamma (IFN γ), on equine luteal cells production of luteotrophic and luteolytic factors. To study protein expression of cytokines FasL and the receptor FAS in the equine CL, immunohistochemistry and western blotting were carried out (CH, n =5; Mid-CL, n =5; Late-CL, n =5). In order to evaluate cytokines effect on prostaglandins and progesterone release from the equine CL, luteal cell cultures from Mid CL (n = 6) were stimulated for 24h, in a 5% CO₂ chamber with: (i) no exogenous cytokines (Control); (ii) FasL(10 ng/mL); (iii) FasL+INF γ (10 ng/mL) and (vi) FasL+TNF α +INF γ (10 ng/mL). Immunohistochemistry analysis for active FasL and FAS showed that both the cytokine and its receptor were present in large luteal cells and endothelial cells throughout the luteal phase. Western blotting analysis showed that immunoreactive bands intensity for FasL increased from Early-CL to Late-CL (p < 0.05), while FAS protein expression did not change throughout the luteal phase. In the Mid-CL luteal cells, FasL alone and FasL+IFN γ inhibited *in vitro* P₄ release (p<0.05), while FasL+IFN γ +TNF α was responsible for the opposite effect (p<0.05). Besides, the PGE₂ production after luteal cell stimulation with FasL alone or combined with other cytokines (FasL+IFN γ +TNF α) was reduced (p<0.05). Nevertheless, all these cytokines increased PGF_{2 α} production (p<0.05). The highest PGF_{2 α} release was observed when the luteal cells were exposed to FasL alone (p<0.05). To the best of our knowledge, this is the first evidence that FasL alone can influence steroidogenic P₄ and prostaglandin F_{2 α} and E₂ production in the mare. Nevertheless, further studies should be performed to clarify the complex action of the Fas/Fas Ligand System on the equine CL.

Supported by the grant PORTUGALIA 78/2007

WPLYW PODANIA RYBOFLAWINY *IN OVO* NA ROZWÓJ EMBRIONALNY I STĘŻENIE HORMONÓW TARCZYCY WE KRWI, SERCU I WĄTROBIE ZARODKA KURY

Karolina Głodek¹, Marcin W. Lis¹, Andrzej Sechman², Barbara Płytycz³
Agnieszka I. Mazur³, Jerzy W. Niedziółka¹

¹*Katedra Hodowli Drobiu, Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny*, ²*Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*, ³*Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie*

Ryboflawina odgrywa kluczową rolę w przemianach energetycznych i procesach utleniania i redukcji. U ssaków wykazano, że istnieje zależność pomiędzy poziomem ryboflawiny w organizmie a stężeniem hormonów tarczycy: tyroksyny (T₄) i trójjodotyroniny (T₃) we krwi. U ptaków, ryboflawina jest niezbędna do prawidłowego przebiegu embriogenezy, a jej niedobór powoduje hipoglikemię i upośledzenie procesu oksydacji kwasów tłuszczowych. W przypadku skrajnego jej niedoboru obserwuje się nagłą śmierć zarodków kurzych ok. 13 doby inkubacji poprzedzoną krótkotrwałym zakłóceniem pracy serca.

W kontekście przedstawionych powyżej informacji, wydawało się interesującym zbadanie wpływu podania ryboflawiny „*in ovo*” na rozwój zarodkowy oraz stężenie hormonów tarczycy we krwi oraz w sercu i wątrobie - narządach charakteryzujących się wysokim tempem metabolizmu jodotyronin.

Ryboflawinę podawano *in ovo* do jaj kurzych w dawkach 0 (kontrola), 60, 600 µg/jajo (n=150 jaj/grupę) w 6 dniu embriogenezy (E6). Inkubację prowadzono w standardowych warunkach. Krew i próbki tkanek serca i wątroby pobierano w E12, E14, E18 i E20 od 10 losowo wybranych zarodków z każdej grupy. Zarówno zarodki, jak i izolowane narządy ważono. Stężenie T₄ i T₃ w osoczu i homogenatach serca i wątroby oznaczano metodą radioimmunologiczną stosując zestaw firmy BRAHMS (Niemcy).

Iniekcja *in ovo* ryboflawiny w dawce 600 µg/jajo zmniejszyła istotnie (p≤0,05) masę ciała zarodków, a także powodowała wzrost stężenia T₄ we krwi w E18 i E20 odpowiednio o 23,9% i 18,1% w porównaniu do grupy kontrolnej (p≤0,05). Zarówno niska, jak i wysoka dawka ryboflawiny spowodowała istotny wzrost stężenia T₄ i T₃ w sercu zarodków w E18 odpowiednio o 51 i 70% oraz 84 i 71% (p≤0,05). Nie zanotowano istotnego wpływu ryboflawiny na stężenie badanych jodotyronin w wątrobie embrionów.

Uzyskane wyniki wskazują, że u ptaków podanie ryboflawiny *in ovo* w początkowej fazie embriogenezy hamuje rozwój zarodka oraz wpływa na funkcję tarczycy i metabolizm jodotyronin w miocytach serca.

Badania sfinansowano z tematów BW 2221/KHDZFiZ/08 i Projekt badawczy własny N N 311 1351 33.

PROLIFERATING CELLS AND MARKERS OF APOPTOSIS IN THE OVARY OF CHICKEN EMBRYO

Agnieszka K. Grzegorzewska, Anna Hrabia, Janusz Rząsa

*Department of Animal Physiology and Endocrinology,
University of Agriculture in Krakow,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Krakow*

Balance between apoptosis and proliferation is a significant aspect of embryonic growth and development. Caspase-3 and -6 are apoptosis mediators involved in the execution phase of cell death. It is well known that ovarian follicles atresia is mediated via apoptosis, but there are no reports concerning expression of caspase-3 and -6 and the localization of apoptotic and proliferating cells in the chicken embryonic ovaries.

The present study was undertaken to analyse the expression of caspase-3 and caspase-6 mRNA and to localize apoptotic and proliferating cells in the left ovary of chicken embryo on 11 (11E) and 17 (17E) day of embryogenesis and just after hatching (1D). Fertilized eggs obtained from Hy-Line Brown hens (n=120) were incubated in standard conditions. On day 11 and 17 of incubation and just after hatching ovaries were isolated, processes for paraffin sections and stained by TUNEL to localize apoptotic cells or PCNA to identify proliferating cells. For the RT-PCR reactions total RNA of gonads was extracted using TRI-Reagent. After DNase treatment and reverse transcription with oligo-dT₍₁₈₎ primer and M-MuLV Reverse Transcriptase, PCR reactions with specific primers and Taq DNA Polymerase were carried out. After electrophoresis data were standardized to 18S rRNA.

The intensity of TUNEL-positive reaction was strong in the cortex and very strong in the medulla and external epithelium of the ovary of the 11E and 17E embryos and 1D chicks. The PCNA positive reaction was very weak in the medulla on 11 day of embryogenesis, and on day 17 and just after hatching very intensive reaction was surprisingly observed only in the cortex of the chicken ovary. The expression of each gene was obtained in female gonads and there were no significant differences among stages.

The results of the present study show, that apoptosis and proliferation regulate cell number and modulate gonadal differentiation in the chicken embryo. The increasing number of proliferating cells in the ovarian cortex detected on day 17 in comparison with day 11 of embryogenesis may suggest, that the cortical tissue starts developing into functional ovary.

This work was supported by BW-2223/KFZ/08

SEX HORMONES AND PROLACTIN PLASMA PROFILES IN ZATORSKA GESE DURING ANNUAL CYCLE

Małgorzata Gumułka, Ewa Kapkowska, *Izrael Rozenboim

*Department of Poultry and Fur Animals Breeding and Animal Hygiene,
Agricultural University in Krakow, Al. Mickiewicza 24/28,30-059 Krakow,
Poland, *Department of Animal Science, The Hebrew University of Jerusalem,
Rehovot, Israel*

Seasonal reproduction of wild birds results in the production of offspring during the optimum time for survival. Endocrine profiles associated with reproductive seasonality have been studied in wild and domestic geese (Akeson et al., 1981; Dittami et al., 1985; Hargitai et al., 1993; Péczely et al., 1993, Xuan et al., 2005; Huang et al., 2008; Shi et al., 2007). However, in the available literature there are no data showing changes in sex hormones and prolactin in domestic geese maintained, during the reproductive period, under artificial photoperiod conditions used in practice. The objective of the study was to determine plasma levels of estradiol (E2), progesterone (P4), testosterone (T) and prolactin (PRL) in long day breeding Zatorska geese throughout the year.

The study was carried out in the flock of Zatorska geese maintained in the Experimental Station of the University of Agriculture in Krakow. Blood samples were taken twice a month from two-year-old males (n = 10) and females (n = 20) geese during the period from September (autumn) to July (summer). During reproduction a photoperiod of 10h light: 14h dark was applied. In non-breeding time natural light conditions were used. The concentration of E2, P4, T and PRL in plasma samples was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the Department of Animal Science, The Hebrew University of Jerusalem, Israel.

The egg-laying period lasted from January to June with the peak of egg-laying in March and a rate of about 30%. In ganders plasma T concentration increased after photostimulation (January), reached a peak level at the end of February, and next gradually decreased as the breeding season progressed to baseline concentration in July. In geese an increase in ovarian steroids before start of egg production was observed with maximum concentrations of E2 in January and P4 in February. During the peak of egg production the highest level of plasma P4 was observed. Nadir concentrations of E2 and P4 were observed from June to July and from July to January, respectively. Plasma PRL level showed a characteristic seasonal pattern in both sexes with a gradual increase coincident with a decrease of egg production rate.

In summary, in long-day breeding Zatorska geese seasonal fluctuations in plasma PRL and sex hormones were showed with a high level of T in males, and P4 in females during the egg-laying period. The plasma pattern of PRL opposite to sex hormones suggests an important role of this hormone in the termination of the breeding cycle.

This study was supported by the grant no. N311 317136

WPŁYW HORMONU WZROSTU NA PROLIFERACJĘ I APOPTOZĘ W JAJNIKU KURY PODCZAS DOJRZEWANIA PŁCIOWEGO

Anna Hrabia, Janusz Rząsa

*Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy, Al.
Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

Ostatnio wykazano ekspresję mRNA hormonu wzrostu (GH) i jego receptora (GHR) oraz zlokalizowano je immunocytochemicznie w pęcherzykach jajnikowych kurek podczas dojrzewania płciowego (Hrabia i wsp. 2008). Wyniki te sugerują udział GH w czynności jajnika. Celem obecnej pracy była próba odpowiedzi na pytanie czy GH wpływa na proces proliferacji i apoptozy w jajniku kury podczas wzrostu i dojrzewania.

Doświadczenie wykonano na kurkach Hy-Line, które w wieku 10 tyg. podzielono na 2 grupy: kontrolną (n=40) i doświadczalną (n=40). Ptaki eksperymentalne otrzymywały podskórnie rekombinowany kurzy GH (200 µg/kg m.c., 3 x w tyg.) od 10. tyg. życia do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Kurki kontrolne otrzymywały rozpuszczalnik (0,9% NaCl). Jajniki izolowano w 10., 12., 14. i 16. tyg. oraz po zniesieniu 1. lub 2. jaja tj. w 17. tyg. Z jajnika pobierano stromę z pęcherzykami pierwotnymi, pęcherzyki białe (1-4mm), żółtawe (4-8mm) i żółte (8-30mm). Na skrawkach parafinowych lokalizowano komórki proliferujące metodą immunocytochemiczną (PCNA) i komórki apoptotyczne metodą TUNEL. Komórki proliferujące i apoptotyczne liczone na 10-15 losowo wybranych obszarach (50 x 50 µm) każdej badanej tkanki przy użyciu programu komputerowego do analizy obrazu MultiScanBase v. 14.02.

Wykazano obecność komórek proliferujących i apoptotycznych w stromie i w ścianie wszystkich pęcherzyków jajnikowych pojawiających się podczas rozwoju jajnika. W porównaniu do kontroli podawanie GH spowodowało: (1) istotny wzrost liczby komórek proliferujących w stromie jajnika w 12., 14. i 17. tyg. życia (odpowiednio 1,6x, 1,25x i 1,3x), w pęcherzykach białych w 14. i 17. tyg. (1,4x i 1,3x) oraz w pęcherzykach żółtawych w 17. tyg. (1,26x), (2) istotny spadek liczby komórek apoptotycznych w stromie w 12., 14., 16. i 17. tyg. (odpowiednio 1,2x, 1,3x, 1,4x i 1,2x) oraz w pęcherzykach białych w 14. i 16 tyg. (1,4x i 1,2x).

Uzyskane wyniki wskazują, że GH regulując proces proliferacji i apoptozy w pęcherzykach prehierarchicznych determinuje wzrost, selekcję i atrezję pęcherzyków jajnikowych kury podczas dojrzewania płciowego.

Finansowanie: grant MNiSW nr 2 P06D 034 28

THE PROCESS OF OOCYTE DEATH IN ATRETIC FOLLICLES OF THE PREPUBERTAL SPINY MOUSE (*ACOMYS CAHIRINUS*)

Monika Hulaś-Stasiak, Antoni Gawron

Department of Comparative Anatomy and Anthropology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

Follicular atresia is a process by which most of the follicles existing in the ovary at birth are lost. It accounts for the loss of about 99% of oocytes in the mammalian ovary. The mechanisms by which granulosa cells and oocytes die in atretic follicles are currently under intense investigation.

The aim of the present work was to characterize the process of cell death of oocytes in atretic ovarian follicles in the immature 7, 14, 21 and 30 day-old spiny mouse with the use of a detailed ultrastructural analysis and immunohistochemical methods.

Our observations demonstrate the following points:

The ultrastructural features of the oocyte death are mainly characterized by the presence of abundant cytoplasmic clear vacuoles and autophagosomes, as well as by absence of chromatin fragmentation, membrane blebbing and apoptotic bodies. These features are common to oocytes in all types of the follicles studied.

The active form of caspase-3 and cleaved PARP1 (the major effectors of apoptosis) are not detected in granulosa cells and oocytes of primordial, primary follicles in all the animals studied. Active caspase-3 and cleaved PARP1 are predominantly visible in granulosa cells of large secondary and antral follicles. Only a small number of oocytes show positive signals for caspase-3.

Thus, the most common pathway for granulosa cell death (especially in antral and large secondary follicles) is apoptosis. The abundance of clear and autophagic vacuoles as well as the lack of mitochondrial and cell swelling characteristic of necrosis in the dying oocytes, lead us to propose an autophagic mechanism of oocyte death.

WYKORZYSTANIE METODY AD (ALLELIC DISCRIMINATION, TAQMAN PCR) DO IDENTYFIKACJI MUTACJI V371M U OWIEC OLKUSKICH

Urszula Kaczor

*Katedra Hodowli Trzody Chlewnej i Małych Przeżuwaczy,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie*

Rodzina transformujących czynników wzrostu β (*the transforming growth factor*) to grupa ponad 35 protein obejmujących: izoformy TGF β (TGF $\beta_{1,2,3}$), hormon zaniku przewodów przyśródnierzowych (AMH), inhibiny- A i B, aktywiny- A, B, AB, morfogenetyczne białka kości (BMP1-BMP20), czynniki wzrostu i różnicowania (GDF1-GDF9, czynnik neurotropowy produkowany przez komórki gleju (GDNF). Transformujący czynnik wzrostu 9 (GDF9) jest jednym z wielofunkcyjnych białek należących do rodziny TGF- β i istotnym czynnikiem regulującym rozwój pęcherzyków jajnikowych u gryzoni, przeżuwaczy oraz ludzi. Owcze białko GDF9 wykazuje strukturalne podobieństwo do białka myszy (66% homologii) oraz człowieka (77%). Gen kodujący białko *GDF9* zlokalizowano u owiec w chromosomie 5. Wykazano obecność jego transkryptu oraz białka w oocycie podczas formowania się pęcherzyka, w pęcherzykach pierwotnych typu I, a także w pęcherzykach będących w fazie intensywnego wzrostu. GDF9 znajduje się także w oocytach zdegradowanych oraz nieprawidłowo uformowanych strukturach pęcherzykowych. U owiec w obrębie genu *GDF9* wykryto 3 mutacje punktowe w obszarze sekwencji kodującym białko dojrzałe i w regionie odpowiadającym za łączenie się czynnika GDF9 z receptorem typu I. Mutacje te są związane z wystąpieniem sterility lub zwiększoną plennością macioerek. W badaniach własnych, stosując mało specyficzną metodę SSCP (*single strand conformation polymorphism*), wykazano u owiec olkuskich, obecność mutacji punktowej identyfikowanej u owiec Belclare i Cambridge w pozycji 1111 nukleotydu (zamiana G w A), czego konsekwencją była zamiana waliny w metioninę w pozycji 371 aminokwasu łańcucha polipeptydowego. Celem podjętego eksperymentu było zastosowanie specyficznej metody Allelic Discrimination (TaqMan PCR) do określenia frekwencji mutacji V371M w populacji 260 owiec. W doświadczeniu wykorzystano materiał biologiczny pobrany od zwierząt, izolując genomowe DNA przy pomocy zestawu odczynników Master Pure™ Genomic DNA Purification Kit (Epicentre Technologies, USA). Wykazano obecność heterozygot AG i homozygot dzikich GG (frekwencja odpowiednio: 0,15 i 0,85), zatem allel A zawierający mutację V371M pojawił się z bardzo niską frekwencją 7,7%.

Praca wykonana w ramach projektu NN 31244533

EKSPRESJA mRNA I IMMUNOLOKALIZACJA BŁONOWEGO RECEPTORA PROGESTERONU (PGRMC1) ORAZ BIAŁKA SERBP1 W CIAŁKU ŻÓŁTYM (CL) KROWY W CZASIE CYKLU RUJOWEGO

Magdalena K. Kowalik, Dominika Słonina, Jan Kotwica

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Progesteron (P4) wpływa na funkcje komórek lutealnych krów na drodze pozagenomowej, częściowo przez oddziaływanie z receptorem błonowym PGRMC1 (*progesterone membrane receptor component 1*). Białko PGRMC1 by wywołać efekt, musi ulec związaniu z innym białkiem - SERBP1 (*serpine 1 mRNA binding protein*). Powstały w ten sposób kompleks błonowego receptora P4 wpływa na transkrypcję genów zaangażowanych w procesy anty-apoptyczne i syntezę białek biorących udział w tworzeniu połączeń międzykomórkowych. Możliwe jest także, że białko PGRMC1 wpływa na proces steroidogenezy.

Celem doświadczeń było: (a) zbadanie ekspresji genu PGRMC1 i SERBP1, oraz (b) immunohistochemiczne określenie lokalizacji białka PGRMC1 i SERBP1 w CL krów podczas cyklu rujowego.

Materiałem do badań były CL pochodzące z jajników nieciążarnych krów i dojrzałych jałówek z: 1-5, 6-10, 11-16 i 17-21 dnia cyklu rujowego (n=4 dla każdej fazy). Ekspresja mRNA genów została wykonana przy użyciu analizy Real-time PCR. W badanej tkance zaobserwowano istotny ($P < 0.01$) wzrost ekspresji genu PGRMC1 w 6-10 dniu cyklu rujowego. Ekspresja genu SERBP1 była istotnie wyższa ($P < 0.01$) w 11-16 dniu cyklu rujowego. Analiza immunohistochemiczna skrawków CL potwierdziła obecność białek PGRMC1 i SERBP1 w tkance lutealnej w każdej fazie cyklu rujowego.

Uzyskane wyniki wskazują na obecność genu i białka PGRMC1 oraz SERBP1 w CL krów, co sugeruje, że niegenomowe działanie P4 w CL może odbywać się przez kompleks białek PGRMC1:SERBP1.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSzW NN 311 348237.

WPŁYW PROGESTERONU, OKSYTOCYNY, PROSTAGLANDYNY E₂ ORAZ WYBRANYCH CZYNNIKÓW WZROSTU NA FUNKCJE WYDZIELNICZE KOMÓREK CIAŁKA ŻÓŁTEGO KLACZY

K. Łukasik¹, D. Pestka¹, A. Galvao², G. Ferreira-Dias², D. Skarzynski¹

¹*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Zakład Immunologii i
Patologii Rozrodu, Olsztyn, Polska*

²*C.I.I.S.A., Faculty of Veterinary Medicine, TU Lisbon, Portugal*

Główną funkcją ciała żółtego (CL) jest produkcja progesteronu (P₄), który jest najważniejszym hormonem kontrolującym cykl jajnikowy i zapewniającym właściwy rozwój ciąży. Tworzenie i rozwój CL kontrolowane są przez hormony gonadotropowe, jak również przez czynniki produkowane lokalnie w macicy i w jajniku. CL wytwarza wiele substancji biologicznie czynnych, m. in. hormony steroidowe i peptydowe, czynniki wzrostu (insulinopodobny czynnik wzrostu - IGF, czynnik wzrostu śródbłonna naczyń VEGF i wiele innych), cytokiny oraz prostaglandyny (PG). Wykazano, że istotnym czynnikiem luteotropowym stymulującym wydzielanie P₄ w komórkach steroidogennych CL jest PGE₂. Powyższe mechanizmy i zależności opisano dotychczas u wielu gatunków zwierząt i u człowieka. Brak jest jednak danych opisujących auto-, parakryne mechanizmy regulacji funkcji CL klaczy. Celem badań było wykazanie wpływu P₄, oksytocyny (OT), PGE₂ oraz wybranych czynników wzrostu (IGF1, VEGF) na wydzielanie P₄ i PGE₂ przez komórki steroidogenne CL klaczy *in vitro*.

Jajniki pozyskiwano 10-15 min po uboju i w ciągu 45 min. przewożono na lodzie do laboratorium. Do badań wykorzystano CL sklasyfikowane na podstawie morfologii jajnika i macicy oraz stężenia P₄ we krwi jako faza środkowo-lutealna (n=7). Enzymatyczną izolację komórek przeprowadzano przy użyciu roztworu enzymatycznego zawierającego 0,05% kolagenazy, 0,005% DNazy-I, wzbogaconego 0,1% BSA. Trawienie tkanki lutealnej przeprowadzano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C. Po czterech 10-minutowych trawieniach komórki były filtrowane przez metalowe sita filtrat płukano poprzez wirowanie przez 10 minut z prędkością 70 g. Komórki były liczone, a ich żywotność wynosiła nie mniej niż 85%. Uzyskane komórki CL zawieszano (2x10⁵/ml) w medium hodowlanym (DMEM/Ham's F-12 wzbogacone 10% surowicy cielęcej oraz 1% Antibiotic Antimycotic Solution) i hodowano w 24 dołkowych płytkach hodowlanych. Po 8-10 godzinach preinkubacji komórki przyklejały się do podłoża płytki, następnie zmieniano medium hodowlane na medium inkubacyjne (DMEM/Ham's F-12 z 0,1% (w/v) BSA i 20µg/ml gentamycyny) i stymulowano komórki wg. schematu: (i) płyn fizjologiczny – kontrola, (ii) P₄ (10⁻⁶M), (iii) OT (10⁻⁷M), (iv) PGE₂ (10⁻⁷M), (v) IGF (50ng/ml) i (vi) VEGF(50ng/ml). Dawki czynników wybrano w serii doświadczeń wstępnych. Po 24 h inkubacji zbierano media i zabezpieczano w celu wykonania analiz EIA.

Ilość uwolnionego P₄ wzrastała po stymulacji OT (p<0.05) i PGE₂ (p<0.01). Natomiast uwalnianie PGE₂ stymulowane było przez P₄, OT, IGF i VEGF (p<0.05). Powyższe wyniki sugerują, iż OT, P₄, PGE₂ oraz czynniki wzrostu

(VEGF, IGF) mogą odgrywać znaczącą rolę jako auto-, parakryne czynniki regulujące funkcje wydzielnicze CL w cyklu jajnikowym oraz mogą działać luteotropowo wzmagając funkcje CL klaczy.

Wykonano w ramach projektu MNiSW PORTUGALIA 78/2007

**PORÓWNANIE ROZWOJU EMBRIOLOGICZNEGO PIELEGNIC
Z JEZIOR TANGANIKI I MALAWI NA PRZYKŁADZIE
MELANOCHROMIS VERMIVORUS ORAZ *CTENOCHROMIS HOREI***

Michał Mięsikowski

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Pracownia histologii i embriologii kręgowców

Melnochromis vermivorus oraz *Ctenochromis horei* to gatunki ryb zamieszkujące dwa różne jeziora afrykańskie (*M.vermivorus* występuje w jeziorze Malawi, natomiast *C.horei* w jeziorze Tanganika). Strategie rozrodu i opieki nad potomstwem u obydwu gatunków są podobne. Są to pyszczaki, których charakterystyczną cechą jest inkubacja zapłodnionej ikry przez samice w jamie gębowej od momentu zapłodnienia aż do uwolnienia w pełni ukształtowanego narybku.

Celem badań jest porównanie, wnikliwy opis oraz dokumentacja fotograficzna przebiegu wczesnej ontogenezy u tych gatunków.

Zapłodniona ikra pobierana była od samic i przechowywana w warunkach laboratoryjnych w specjalnie do tego celu skonstruowanym inkubatorze w którym przez cały okres inkubacji utrzymywano jednostajne warunki. Pomiarów ikry, zarodków oraz larw dokonywano za pomocą mikroskopu stereoskopowego wyposażonego w okular z podziałką mikrometryczną.

Cały rozwój podzielono na dwa zasadnicze stadia: stadium zarodka oraz stadium larwy. Podczas badania rozwoju w trakcie trwania stadium zarodka brano pod uwagę następujące cechy: wysokość i szerokość zapłodnionego jaja, wysokość i szerokość nadżółtkową, a w trakcie kształtowania się zarodka również wysokość i szerokość oczu oraz długość zarodka i liczbę uderzeń serca na minutę. Podczas trwania stadium larwalnego mierzono: długość przedgrzbietową, długość głowy bocznej, szerokość i wysokość oczu, długość przedanalną, długość ciała, całkowitą długość ciała, największą wysokość ciała oraz wysokość i szerokość woreczka żółtkowego. Starano się także określić m.in. kiedy następuje początek organogenezy, w jakim momencie pojawiają się pierwsze komórki barwnikowe, pierwsze skurcze mięśni, kiedy zaczyna pracować serce, po jakim czasie następuje przejście ze stadium zarodka w stadium larwy oraz kiedy zaczynają kształtować się płetwy.

Pilotażowe wyniki wykazały, że rozwój zarówno u *M.vermivorus* jak i u *C.horei* przebiega podobnie jednak u *C.horei* przy jednakowej temperaturze inkubacji (25,0°C) jest on szybszy i w pełni ukształtowany narybek pojawia się po 21 dniach inkubacji podczas gdy u *M.vermivorus* po upływie około 27 dni.

IMMUNOLOCALIZATION OF ANDROGEN RECEPTOR AND AROMATASE IN CORPORA LUTEA OF 1- TO 1.5-YEAR-OLD MARES

Wiesława Młodawska

*University of Agriculture, Department of Animal Reproduction and Anatomy,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

The corpus luteum (CL) is an important regulator of female reproductive function. The presence of CL in the ovary of a young female is a sign of puberty onset. This gland secretes progesterone and a number of substances and hormones, including estrogens, as indicated by the presence of aromatase in the luteal cells of corpora lutea in many species of mammals, including horses (Albrecht and Deals, 1997). Research suggests that nonaromatizable androgens can regulate CL functions directly through androgen receptors (Hild-Petito et al., 1991; Słomczyńska et al., 2006). The aim of this study was immunohistochemical localization of aromatase and androgen receptors (AR) in the corpora lutea of pubertal mares.

The study was performed on paraffin sections of corpora lutea (n=8) collected postmortem from the ovaries of mares aged 1-1.5 years and 5 corpora lutea of mares aged >5 years (control group). Based on morphological evaluation, CL were classified as early, mature and regressing (Wesson and Ginther, 1981). Aromatase and androgen receptors were immunolocalized using mouse monoclonal antibody against human cytochrome P450arom and rabbit polyclonal antibody against androgen receptors, respectively. Immunostaining for P450arom was observed in the cytoplasm of luteal cells of all corpora lutea regardless of mares' age. The reaction was more intense in early and mature CL than in regressing gland. Androgen receptors were found in the luteal cells nuclei of all early and most mature corpora lutea. In regressing CL, only some cells showed weak colour reaction. No relationship was found between mares' age and expression of aromatase and androgen receptors in corpora lutea. The presence of both androgen receptors and aromatase in luteal cells of the mares is dependent on the physiological status of the corpus luteum. The presence of androgen receptors suggests a local role of androgens in the regulation of CL function in the mare. This is the first study to show the presence of androgen receptors in the corpora lutea of the mares.

Supported by Polish Ministry of Education and Science as grant No 2 P06D 042

OREXIN TYPE 2 RECEPTOR PROTEIN EXPRESSION IN THE PORCINE OVARY DURING THE OESTROUS CYCLE

Anna Nitkiewicz, Nina Smolińska, Jadwiga Przała, Tadeusz Kamiński

Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-718 Olsztyn-Kortowo, e-mail: anna.nitkiewicz@uwm.edu.pl

Orexin A and B are newly discovered neuropeptides synthesized mainly in lateral hypothalamus and associated with many physiological functions. Both orexins act through specific, G protein-coupled protein receptors termed orexin receptor 1 (OX1R) and orexin receptor 2 (OX2R). Orexins are implicated in regulation of feeding, sleep and wakefulness, arousal and locomotor activity, as well the reproductive system. To our knowledge there is no data concerning the role of orexin system in porcine ovary, among others OX2R protein expression in this gland during the oestrous cycle. Therefore, the aim of the study was the comparison of OX2R protein content in corpora lutea on days 2-3, 10-12 and 14-16 of the oestrous cycle and in granulosa and theca interna cells during days 17-19 of the cycle, using Western blot analysis. The protein samples were electrophoresed on 12,5% SDS polyacrylamide gel, separately for OX2R and actin, and then transferred to nitrocellulose membranes. After blocking in TBST with 5% skimmed milk, membranes were incubated overnight with mouse polyclonal antibodies for OX2R at a dilution 1:300 or rabbit polyclonal antibodies for actin at a dilution 1:200, which were used as a internal control. After washing in TBST buffer, membranes were incubated for 1.5 hour with secondary goat anti-mouse IgG antibodies for OX2R (diluted 1:500), or goat anti-rabbit IgG for actin (diluted 1:5000) conjugated with alkaline phosphatase. As a detector of immunocomplex was used NBT/BCIP system. The results of Western blot were quantified by densitometric scanning of immunoblots with GelScan for Windows ver. 1.45 software. Data were expressed as a ratio of OX2R protein relative to actin protein in arbitrary optical density units. OX2R protein was greatest on days 10-12 compared to 2-3 day and granulosa and theca cells from 17-19 of the oestrous cycle ($p < 0.05$). The lowest protein level was observed in granulosa and theca cella from days 17-19 of the cycle. In conclusions, sensitivity of ovaries to orexins changes during the oestrous cycle. Moreover, diversified OX2R protein expression may suggest that orexins play an important role in control of pig reproductive system.

This research was supported by Ministry of Science and Higher Education (project No N N308 122134, 2008-2011)

IN VIVO ASSESSMENT OF OVARIAN FOLLICLE DEVELOPMENT IN PUBERTAL FILLIES

Adam Okólski, Wiesława Młodawska

*University of Agriculture, Department of Animal Reproduction and Anatomy,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

The aim of the study was *in vivo* assessment of ovarian activity in filly aged from 5-6 months until puberty. Nine fillies of the breeds: Polish Pony (n=7), Anglo-Arab (n=1) and 1 crossbred (female Pony × male Thoroughbred) were used in the study. Fillies were placed in a restraining chute and examined by ultrasonography (Honda 1500 scanner, with a 5 MHz rectal probe). Ovary state was evaluated and follicles were counted and measured for diameter based on clinical examination and images displayed on the monitor. Special attention was given to the presence of corpora lutea. Polish Pony fillies were examined at 2-month intervals to approximately 8 months of age. In the Anglo-Arab filly, crossbred filly and older Polish Pony fillies, ovaries were observed every 2 weeks.

In the Anglo-Arab and crossbred fillies, the number of visible follicles in the autumn-winter period was similar and ranged from 1 to 6/ovary, the largest having a diameter of 12 mm and 18 mm, respectively. In March, a luteinized follicle was found on the right ovary of the Anglo-Arab filly at 12 months of age. First ovulation occurred in June on the left ovary at 15 months of age. In the crossbred filly, first ovulation was observed in May at 21 months of age. Preovulatory follicle was 39.9 mm in diameter. In both fillies, the next ovulation occurred after a month. In Polish Pony fillies aged 5-12 months, up to 4-5 growing follicles/ovary smaller than 7 mm in diameter were found in the autumn-winter period. To approximately 16 months of fillies' age, the follicles showed no wave-like pattern of growth. First ovulation was observed in fillies aged approximately 14-16 months. It should be stressed that rectal examination of Polish Pony fillies aged below 8 months is often impossible due to the relatively small diameter of rectum and the possibility of mechanical damage. In most fillies examined, ovarian maturity and first follicle ovulation were not paralleled by cervical dilation. Based on the clinical and ultrasound examination of the reproductive tract and ovaries of the mares, it was found that functional maturity of the ovary and first ovulation are not paralleled by cervical dilation.

Supported by the Polish Ministry of Education and Science as a grant No 2 P06D 042 30.

WPŁYW JODOTYRONIN NA EKSPRESJĘ GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKO *StAR* I ENZYMY PROCESU STEROIDOGENEZY W BIAŁYCH PĘCHERZYKACH JAJNIKOWYCH KURY

Katarzyna Pawłowska, Andrzej Sechman

*Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, e-mail: k_pawlowska@onet.eu*

Wcześniejsze nasze badania dowodzą, że u kury (*Gallus domesticus*) trijodotyronina (T_3) i 3,5-dijodotyronina (T_2) wpływają na sekrecję hormonów steroidowych z pęcherzyków jajnikowych. Jednakże, wewnątrzkomórkowy mechanizm działania obu jodotyronin w komórkach steroidogennych nie został dotychczas wyjaśniony. Dlatego też w obecnej pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie: czy T_3 i T_2 wpływają na proces transkrypcji mRNA genów uczestniczących w procesie steroidogenezy: białka *StAR*, *CYP11* (P450_{scc}), *HSD3B* (3 β -HSD) oraz *CYP19* (P450_{arom}) w białych pęcherzykach jajnikowych kury?

Doświadczenie przeprowadzono na kurach Hy-Line Brown (n=12), które dekapitowano 22,5 h przed owulacją. Z jajnika izolowano białe pęcherzyki o średnicy 1-4 mm (SWF) oraz 4-8 mm (LWF). Pęcherzyki inkubowano w medium Eagle'a przez 6 h w następujących grupach: kontrola, LH, T_3 , LH+ T_3 , T_2 i LH+ T_2 . Stężenie każdego hormonu wynosiło 10 ng/ml medium. Analizę ekspresji mRNA badanych genów przeprowadzono metodą Real-Time PCR z użyciem sond TaqMan MGB w aparacie StepOne Plus (Applied Biosystems).

W pęcherzykach SWF, LH stymulowało ekspresję mRNA genu *CYP11*, natomiast T_3 zwiększało istotnie ekspresję genów *StAR* i *CYP11*. W pęcherzykach LWF zarówno LH jak i T_3 stymulowały ekspresję mRNA wszystkich badanych genów. T_3 zwiększała stymulowaną przez LH ekspresję mRNA genów *CYP11* i *CYP19* w SWF oraz genu *HSD3B* w LWF, natomiast zmniejszała ekspresję białka *StAR* i *CYP11* w pęcherzykach LWF. W pęcherzykach SWF T_2 stymulowała ekspresję mRNA genów *StAR*, *CYP11* i *CYP19*, natomiast w LWF jedynie genu *StAR*. Nie stwierdzono wpływu T_2 na ekspresję mRNA *HSD3B*. Jodotyronina ta hamowała stymulowaną przez LH ekspresję genu *StAR* i *CYP19* w SWF oraz wszystkich badanych genów w pęcherzykach LWF. Uzyskane wyniki wskazują, że w białych pęcherzykach jajnikowych obie badane jodotyroniny są modulatorami transkrypcji genu *StAR* oraz genów kodujących enzymy procesu steroidogenezy. Efekt działania T_3 i T_2 zależy od wielkości pęcherzyka; T_2 wpływa głównie na małe pęcherzyki (1-4 mm), natomiast T_3 na pęcherzyki duże (4-8 mm). Badane jodotyroniny oddziałują również na regulowaną przez LH ekspresję mRNA badanych genów. Nie można wykluczyć, że obserwowane efekty działania jodotyronin związane są z ich wpływem na wewnątrzkomórkowy szlak transdukcji sygnału LH w komórkach steroidogennych jajnika.

Badania finansowane z grantu N N311 006436

UDZIAŁ JODOTYRONIN W REGULACJI PROCESU PROLIFERACJI KOMÓREK ZIARNISTYCH W JAJNIKU KURY (*GALLUS DOMESTICUS*)

Katarzyna Pawłowska, Danuta Wrońska-Fortuna, Andrzej Sechman

*Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, e-mail: k_pawlowska@onet.eu*

Celem badań była próba odpowiedzi na pytania: 1) czy 3,5-dijodotyronina (3,5-T₂) i trijodotyronina (T₃) uczestniczą w procesie proliferacji komórek ziarnistych w pęcherzykach jajnikowych niosącej kury; 2) oraz czy istnieją różnice w oddziaływaniu 3,5-T₂ i T₃ na proliferację w badanych pęcherzykach.

Doświadczenie zostało przeprowadzone na kurach Hy-Line Brown (n=6) w wieku 30 tygodni, od których 22,5 h przed owulacją pobrano pęcherzyki przedowulacyjne F1, F3, F5 i F6 (20-35 mm). Z pęcherzyków izolowano warstwę ziarnistą, którą trawiono enzymatycznie kolagenazą (10 min, 37°C) w celu dyspersji komórek. Komórki (5 x 10⁵/dołek) inkubowano przez 24 h w 1 ml pożywki Eagle'a na płytkach 24-dołkowych w temp. 39°C w następujących grupach: kontrola, hormon luteotropowy (LH), 3,5-T₂, LH+T₂, T₃ i LH+3,5-T₃ (10 ng/ml każdego hormonu) z dodatkiem tymidyny znakowanej trytem (1 µCi dołek). Po inkubacji przeprowadzono lizę komórek, a następnie zawartość każdego dołka przenoszono do płynu scyntylicyjnego w celu pomiaru radioaktywności w liczniku promieniowania β.

Stwierdzono stopniowy spadek proliferacji komórek ziarnistych w miarę wzrostu i dojrzewania pęcherzyka przedowulacyjnego od stadium F6→F1. LH zwiększyło proliferację komórek ziarnistych pęcherzyków F5+F6 (o 15%, P<0,05) oraz F3 (o 72%, P<0,01), natomiast nie wpływał istotnie na syntezę DNA w największym pęcherzyku F1. Nie stwierdzono wpływu 3,5-T₂ na proliferację komórek ziarnistych w badanych pęcherzykach, jednakże jodotyronina ta hamowała stymulowaną przez LH proliferację w pęcherzykach F5+F6 i F3 odpowiednio o 20% (P<0,05) i 37% (P<0,01). T₃ zmniejszyła o 15% (P<0,05) proliferację komórek w pęcherzykach F5+F6. Hormon ten hamował również stymulowaną przez LH proliferację komórek ziarnistych pęcherzyków F5+F6 i F3 odpowiednio o 28% i 36% (P<0,01).

Wyniki badań wskazują, że (i) głównym regulatorem proliferacji komórek ziarnistych jest T₃, której działanie zależy od stopnia rozwoju pęcherzyka; (ii) obie jodotyroniny blokują efekt działania LH w komórkach ziarnistych jajnika kury. Uzyskane dane sugerują, że badane jodotyroniny uczestniczą w procesie wzrostu i dojrzewania przedowulacyjnych pęcherzyków jajnikowych kury. Hormony te pełnią rolę inhibitora procesu proliferacji komórek warstwy ziarnistej pęcherzyka.

Badania wykonano w ramach „InnoGrant - Program wspierania innowacyjnej działalności doktorantów”.

REGULACJA STEROIDOGENEZY NA POZIOMIE MOLEKULARNYM W CIAŁKU ŻÓŁTYM (CL) KROWY- UDZIAŁ PROGESTERONU (P4), OKSYTOCYNINY(OT) I NORADRENALINY (NA)

Robert Rękawiecki, Jan Kotwica

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn

Progesteron działa na komórki docelowe poprzez jądrowy receptor (PR), który składa się z dwóch izoform PR-A i PR-B (PR-A działa jako inhibitor PR-B). Hormon ten wzmacnia aktywność i ekspresję genu 3β -HSD w CL krowy. Z kolei NA stymuluje sekrecję P4 i OT, aktywność P450_{scc} i 3β -HSD oraz post-translacyjną przemianę OT. Natomiast jajnikowa OT pobudza uwalnianie P4 we wczesnej fazie cyklu. Dlatego celem pracy było określenie: (a) czy luteotropowy wpływ NA odbywa się poprzez wzrost poziomu receptorów: P4, OT (OT-R) oraz β_2 -R w CL, (b) czy P4 wpływając na ekspresję genu dla PR, OT-R i β_2 -R, może regulować własną syntezę, oraz (c) określenie korelacji między poziomami ekspresji genu i poziomami białek OT-R, β_2 -R w stosunku do hormonu przyłączonego do danego receptora.

Komórki lutealne ($10^6/4$ ml medium) z 6-10 i 11-16 dnia cyklu rujowego inkubowano 6 h i 24 h z LH (100ng/ml), P4 (10^{-5} M), NA (10^{-5} M), OT (10^{-7} M) oraz prostaglandyną E₂ (PGE₂) (10^{-6} M). W komórkach po 6 h stymulacji oznaczono ekspresję mRNA metodą Real-time PCR, a po 24 h stymulacji, poziom białek dla PR, OT-R, β_2 -R metodą western blot. W kolejnych badaniach wykorzystano CL z 1-5, 6-10, 11-16 i 17-21 dnia cyklu rujowego (n=4/fazę cyklu). W tkance oznaczono ekspresję mRNA i poziom białka dla PR, OT-R i β_2 -R oraz oznaczano stężenie hormonów.

Wykazano że: (a) LH i PGE₂ regulują ekspresję genu PR, (b) OT zwiększa ekspresję genu OT-R a P4 także i białka dla tego receptora, (c) NA nie wpływa na ekspresję żadnego z badanych genów oraz białek, (d) ekspresja genu OT-R i β_2 -R jest ujemnie skorelowana z produktami tych genów. Dane te sugerują istnienie systemu sprzężeń zwrotnych w CL krowy, wzmacniających produkcję P4.

WPLYW WYBRANYCH CZYNNIKÓW NA CZAS WYSTĄPIENIA MENOPAUZY ORAZ NA STĘŻENIA HORMONÓW E₂ I FSH W SUROWICY W ZALEŻNOŚCI OD CZASU JAKI UPŁYNAŁ OD OSTATNIEJ MIESIĄCZKI.

Rumianowski Bogdan¹, Laszczyńska Maria¹, Brodowska Agnieszka², Piasecka
Małgorzata¹, Karakiewicz Beata³

*Samodzielna Pracownia Histologii i Biologii Rozwoju*¹, *Klinika Ginekologii i
Uroginekologii*², *Zakład Zdrowia Publicznego*³

Menopauza oznaczająca zakończenie funkcji rozrodczych kobiety nie jest równoznaczna z całkowitym zanikiem aktywności steroidogenezy jajnikowej. Wprawdzie jajnik po menopauzie jest znacznie mniejszy niż w wieku rozrodczym, zmienia się także znacząco jego struktura, ale wciąż w jego zrębie, w komórkach wnęki oraz w ścianie naczyń krwionośnych aktywne są kluczowe enzymy i receptory steroidogenezy jajnikowej i nadal syntetyzowane są w gonadzie hormony steroidowe. Przeprowadzone badania własne (Brodowska et al. 2007, Laszczyńska et al. 2008) dotyczące szczegółowych zmian morfologii jajnika po menopauzie wykazały, że w porównaniu do wieku rozrodczego, po menopauzie, w korze dochodzi głównie do zmniejszenia się jej grubości i ilości pęcherzyków jajnikowych, powstania nabłonkowych cyst inkluzyjnych, natomiast w rdzeniu dochodzi do zmiany architektoniki naczyń i hialinizacji ich ścian. Jednak, jak wynika z piśmiennictwa, na wiek wystąpienia menopauzy ma także wpływ szereg czynników środowiskowych. Przede wszystkim: czas wystąpienia menarche, ilość przebytych ciąż, stosowanie używek, głównie palenie papierosów, a także wiele czynników socjoekonomicznych. Celem naszych badań było określenie zmian średnich stężeń hormonów E₂ i FSH w zależności od czasu jaki upłynął od ostatniej miesiączki (OM) oraz określenie wpływu wybranych czynników środowiskowych na czas wystąpienia OM.

Do badań zakwalifikowano 150 kobiet po menopauzie, które podzielono na 3 grupy ze względu na czas jaki upłynął od OM: grupa A (mniej niż 5 lat od OM), grupa B (6-10 lat od OM), grupa C (ponad 10 lat od OM). Wśród nich przeprowadzono ankietę oraz pobrano krew w celu oznaczenia stężenia hormonów E₂ i FSH. Ankieta zawierała pytania dotyczące, m. in. wieku kobiet, czasu wystąpienia OM, wieku, w którym odbył się pierwszy poród, ilości porodów, palenia tytoniu, wzrostu, wagi, wykształcenia, miejsca zamieszkania.

Analizą statystyczną stwierdzono znaczny spadek wartości średnich stężenia E₂ w grupie B i C w porównaniu z grupą A. Wyniki wskazują na wcześniejsze wystąpienie OM u kobiet palących w porównaniu z kobietami niepalącymi. Wyniki wskazują również, że kobiety które pierwsze dziecko urodziły po 25 roku życia wcześniej przechodzą menopauzę. Natomiast nie stwierdzono zależności pomiędzy BMI (body mass index), a średnim stężeniem estradiolu oraz FSH w surowicy badanej grupy kobiet.

FOLIKULARNA FUNKCJA JAJNIKÓW KÓZ PODCZAS STYMULACJI AKTYWNOŚCI PŁCIOWEJ W ANESTRUS

Tomasz Schwarz, Maciej Murawski, Edward Wierzchoś

*Katedra Hodowli Trzody Chlewnej i Małych Przeżuwaczy, Uniwersytet Rolniczy,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

Celem badań była kontrola wzrostu pęcherzyków jajnikowych kóz w okresie anestrus w czasie medykacji gestagenami i PMSG. Badania przeprowadzono w maju i czerwcu na 4 kozach białych uszlachetnionych utrzymywanych w warunkach naturalnego dnia świetlnego. Dynamikę wzrostu pęcherzyków i przebieg owulacji śledzono z zastosowaniem techniki USG (Aloka SSD 500V) przez 42 dni obejmujące czternastodniową dopochwową aplikację gąbek nasączonych 40 mg FGA i stymulację jajników 500 j.m. PMSG, oraz okres aktywności ciała żółtego aż do zakończenia wzrostu fali pęcherzyków rozpoczynających rozwój po luteolizie.

W okresie 21 dni poprzedzających owulację rozwijało się średnio 18,5 (± 1) pęcherzyków, z czego 11,25 ($\pm 0,5$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm. Utworzyły one średnio 4,5 ($\pm 0,6$) fal wzrostu. Cztery pierwsze fale nie różniły się istotnie liczbą rosnących pęcherzyków obu analizowanych klas tj. o średnicy ≥ 4 mm i ≥ 5 mm. Pomiędzy 48 a 72 godziną od iniekcji PMSG u wszystkich kóz zaobserwowano objawy rui i wzrost owulacyjnej fali o liczebności 6 ($\pm 1,15$) pęcherzyków w tym 5 ($\pm 1,41$) dużych ($P \leq 0,01$). Natomiast w cyklu rujowym występującym po owulacji w trzech falach wzrostu rozwijało się średnio 11 ($\pm 1,63$) pęcherzyków, z czego 3,75 ($\pm 0,96$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm. Charakterystycznym było to, że u trzech samic u których zaobserwowano pęcherzyki przetrwałe utrzymujące się aż do 18 dnia cyklu, po pojawieniu się pierwszej fali następowała nieoczekiwanie długa przerwa i kolejne, czyli 2 i 3 pojawiały się dopiero od dnia 11, czyli w terminie w jakim normalnie pojawiają się fale 4 i 5. U tych kóz wysoce istotnie więcej pęcherzyków małych ($P \leq 0,01$) odnotowano w falach 1 i 3, zaś w przypadku pęcherzyków dużych różnic pomiędzy falami nie było. W 18 dniu po owulacji zaobserwowano spontaniczną regresję ciała żółtego, jednak nie doszło w tym czasie do aktywacji folikularnej jajników i owulacji.

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że zastosowanie gestagenów i PMSG u kóz w anestrus stymuluje falowy wzrost dużej puli pęcherzyków z których tylko kilka ulega owulacji. Przedłużająca się zaś obecność w jajnikach pozostałych pęcherzyków zaburza regularność pojawiania się fal w przebiegu folikulogenezy w okresie kolejnych 21 dni.

CZY ZASTOSOWANIE β -BLOKERÓW MOŻE MODYFIKOWAĆ FUNKCJE ROZRODCZE LOCH?

Tomasz Schwarz, Jacek Nowicki, Magdalena Jelonek

*Katedra Hodowli Trzody Chlewnej i Małych Przeżuwaczy, Uniwersytet Rolniczy,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków*

Zapobieganie lub zwalczanie stresu u loch w okresie okołoodsadzeniowym w hodowli wielkotowarowej jest od wielu lat postępowaniem rutynowym które skutkuje ograniczeniem agresji i uszkodzeń ciała podczas walk hierarchicznych. Jednak nierozpoznanym dotychczas pozostaje wpływ takiego działania na funkcje rozrodcze i wskaźniki reprodukcyjne stad.

Celem przeprowadzonych badań było przeanalizowanie w warunkach produkcyjnych wpływu podawania powszechnie zalecanego środka uspokajającego – azaperonu (Stresnil-Janssen Pharmaceutica Belgia) na funkcje rozrodcze loch oceniane na podstawie wskaźników ich użytkowości rozplodowej tj. czasu trwania okresu od odsadzenia do pierwszego i skutecznego pokrycia, skuteczności krycia, wskaźnika oproszeń, długości cyklu reprodukcyjnego i częstotliwości oproszeń, oraz liczby prosiąt urodzonych w miocie. Analizą objęto 1799 loch, w tym 619 poddanych działaniu azaperonu w dawce 2 mg/1kg m.c. i 1180 kontrolnych. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli.

Wskaźnik	Grupa doświadczalna	Grupa kontrolna
Odsadzenie - I pokrycie (dni)	8,73 (\pm 10,12) ^b	6,25 (\pm 8,13) ^a
Skuteczne pokrycie (dni)	16,04 (\pm 23,16) ^b	9,36 (\pm 15,56) ^a
Skuteczność krycia (%)	86,79 (\pm 28,41) ^b	91,25 (\pm 25,6) ^a
Wskaźnik oproszeń (%)	84,37 (\pm 31,23) ^b	88,8 (\pm 29,1) ^a
Cykl reprodukcyjny (dni)	160,36 (\pm 23,84) ^b	153,75 (\pm 17,57) ^a
Częstotliwość oproszeń	2,32 (\pm 0,27) ^b	2,4 (\pm 0,22) ^a
Liczba prosiąt urodzonych (szt.)	11,78 (\pm 2,97) ^b	11,33 (\pm 3,17) ^a
Żywo urodzone (szt.)	11,17 (\pm 2,84) ^b	10,66 (\pm 3,04) ^a
Martwo urodzone (szt.)	0,53 (\pm 1,17)	0,59 (\pm 1,41)

^{ab} wartości oznaczone innymi literami różnią się istotnie ($P \leq 0,05$)

Podanie azaperonu, który bardzo szybko i skutecznie obniża reakcję stresową loch spowodowało równocześnie opóźnienie powrotu funkcji rozrodczych u samic po okresie laktacyjnego anestrus. To pozornie negatywne wydłużenie okresu odpoczynku okazało się jednak efektem pozytywnym gdyż umożliwiło prawdopodobnie osiągnięcie dojrzałości większej liczbie pęcherzyków jajnikowych co doprowadziło do zwiększenia liczby prosiąt urodzonych w miocie.

WPŁYW LH I HORMONÓW STEROIDOWYCH NA EKSPRESJĘ GENU LEPTYNY W KOMÓRKACH LUTEALNYCH ŚWINI W FAZIE PÓŹNOLUTEALNEJ CYKLU RUJOWEGO

Gabriela Siawrys

*Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 1A, 10-718 Olsztyn, gabri@uwm.edu*

Leptyna, produkt genu *ob*, jest 16 kDa białkiem biorącym udział w kontroli wielu procesów fizjologicznych związanych z rozrodem. Wykazano, że hormon ten przyspiesza dojrzewanie płciowe, wpływa na płodność, implantację zarodka i rozwój płodu. W jajniku leptyna może uczestniczyć w procesie dojrzewania oocytu, angiogenezie i owulacji. Przypuszcza się, że odgrywa stymulującą rolę w formowaniu ciała żółtego oraz podtrzymuje jego funkcje, działając jako czynnik antyapoptotyczny. Wykazano też jej bezpośredni wpływ na uwalnianie steroidów przez komórki jajnika. Stosując metody RT-PCR i hybrydyzację *in situ*, zlokalizowano transkrypt leptyny i jej receptora w jajniku świni w fazie lutealnej cyklu rujowego oraz wykazano, że poziom ekspresji tych genów jest zróżnicowany. Istnieje przypuszczenie, że na poziom mRNA tych genów mogą wpływać różne czynniki docierające do tego gruczołu wraz z krwią lub produkowane lokalnie na terenie jajnika. Ostatnio stwierdzono, że LH i estrogeny mogą być zaangażowane w regulację ekspresji genu leptyny w komórkach lutealnych świni w okresie wczesnej ciąży. *Celem* podjętego eksperymentu było zbadanie wpływu LH i hormonów steroidowych – estradiolu (E_2) i progesteronu (P_4) na poziom ekspresji mRNA leptyny w komórkach lutealnych świni w fazie późnolutealnej cyklu rujowego (14-16 dzień).

Materiały i metody: Wyizolowane komórki lutealne świni (10^6 /ml medium F12) po wstępnej hodowli (48 godzin) były hodowane przez 24 godziny w obecności LH (1; 10 i 100 ng/ml), E_2 (0,02; 0,2; 2 i 20 ng/ml) i P_4 (20; 100 i 200 ng/ml). Całkowity RNA był izolowany z komórek przy użyciu Trizolu. Uzyskany 1 μ g RNA wykorzystano jako matrycę do zsyntetyzowania komplementarnego DNA (cDNA) podczas reakcji odwrotnej transkrypcji. Ekspresja mRNA leptyny była analizowana metodą Real-Time PCR.

Wyniki: Nie stwierdzono istotnego wpływu LH, E_2 i P_4 na poziom transkryptu leptyny w komórkach lutealnych świni w 14-16 dniu cyklu rujowego.

Wnioski: Uzyskane wyniki sugerują, że u świni LH i steroidy nie uczestniczą w regulacji ekspresji genu leptyny w komórkach lutealnych świni w fazie późnolutealnej cyklu rujowego.

Praca finansowana przez MNiSW (Projekt: N N311 098634)

THE PRESENCE OF SEROTONIN RECEPTOR TRANSCRIPTS DURING EARLY AVIAN DEVELOPMENT

Urszula Stepieńska, Bożenna Olszańska

*Institute of Genetics and Animal Breeding, Polish Academy of Sciences,
Jastrzębiec n. Warsaw*

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) has been known as a neurotransmitter produced and acting in the nervous system of mammals. Presently, it is known that 5-HT is also present and synthesized in many peripheral tissues and its receptors are widely distributed in many tissues. We suggest that 5-HT and its related molecule - melatonin, can act as signaling molecules in local coordination/intracellular communication. The role of 5-HT in invertebrate and mammalian development has been investigated and confirmed previously, as well as its presence in the avian yolk.

There are 14 functionally different 5-HT receptors divided up into 7 families in mammals (5-HT 1-7), and out of them 9 are known for birds. They are: 5-HT1a, 5-HT1f, 5-HT2b, 5-HT2c, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5a, 5-HT6, 5-HT7a. Except for the 5-HT 3 receptor which is ligand-gated ion channel, all the other 5-HT receptors belong to the large family of G-protein-linked receptors. Previously, we have found the presence of melatonin receptors in quail germ cells and embryos.

The main purpose of our project has been to show the presence of 5-HT receptor transcripts in the early quail embryos to confirm the suggestion that 5-HT may have a role in avian development before differentiation of the nervous system.

Materials and methods: The experiments were performed using early Japanese quail embryos: at cleavage (the stages II-IV Eyal Giladi) and during area pellucida formation (the stages VI/VII E.G.) isolated from the uterine eggs, and at the stages X/XI E.G. from the freshly laid eggs. To determine the presence of the 5-HT receptors we used reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA, devoid of DNA contamination, was isolated using Invisorb RNA kit II (InViTek GmbH, Germany). The RNA was reverse transcribed with the use of M-MLV reverse transcriptase and obtained cDNA was amplified by PCR with the use of Red-Taq polymerase (Sigma). The primers were designed using the computer program "Primers 3" based on cDNA sequences of chicken 5-HT receptors published in Gene Bank. As a reference gene we used GAPDH. The PCR products were resolved on 2% agarose gel containing ethidium bromide.

Results. The presence of all 9 avian 5-HT receptor transcripts have been found in the brain of adult quails used a positive control. In all 3 investigated embryonic stages serotonin receptor transcripts 5-HT1f, 5-HT2b, 5-HT2c, 5-HT4, 5-HT6 and 5-HT7a were detected. However we have found that the transcripts for receptors 5-HT1a, 5-HT3 and 5-HT5a were absent or expressed very faintly.

Conclusion. We propose that serotonin and melatonin could participate in putative "diffuse neuroendocrine system" as signaling molecules in cell communication, regulating early developmental processes well before the formation of neural and hormonal systems.

**IMMUNOEXPRESSION OF STEROIDOGENIC ENZYMES AND
STEROID PRODUCTION BY RAT POSTOVULATORY CUMULI
OOPHORI. EFFECT OF ANDROGENS**

Maria Szoltyś, Maria Słomczyńska, Katarzyna Knapczyk-Stwora, Małgorzata
Durlej, Agnieszka Starowicz

*Department of Endocrinology and Tissue Culture, Chair of Animal Physiology,
Institute of Zoology, Jagiellonian University, Kraków*

Immunolocalization of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD), cytochrome P450c17 (P450c17) and androgen receptor (AR) was investigated in the rat cumuli oophori (COCs) of late preovulatory follicles and postovulatory COCs bearing fertilized oocytes. A gradient of intensity of 3β -HSD immunostaining was observed in the granulosa layer of preovulatory follicles, with almost negative immunostaining in COCs and with the strongest immunoreaction in the mural granulosa cells. Postovulatory COCs showed strong 3β -HSD immunolabelling in the peripheral regions and weak labelling near the oocyte, suggestive of responsiveness of cumulus cells to an anti-luteinizing effect exerted by the fertilized oocyte. In preovulatory follicles a weak P450c17 immunostaining was limited to expanded cumulus granulosa cells and the positive immunolabelling persisted in postovulatory COCs. P450c17 immunostaining was also found in ampullary epithelial cells. A strong AR immunostaining was confined mainly to the COCs in preovulatory follicles and a similar immunoreaction was present in the granulosa cells of ovulated COCs. Simultaneous AR and cytochrome P450c17 immunolabelling in the pre- and postovulatory COCs was suggestive of an intra- and paracrine androgen regulation of the cumulus granulosa cell function. In the next experiment the effect of androgens on steroidogenic function of postovulatory cumulus granulosa cells was investigated. Ampullary fertilized COCs were isolated and incubated in the presence of medium alone (control), testosterone, 2-hydroxyflutamide or both testosterone and 2-hydroxyflutamide. In the collected media progesterone and estradiol were estimated by appropriate RIAs. The experiment is in progress.

Supported by DS/770-K/ZDS/000781

STĘŻENIE WYBRANYCH HORMONÓW STEROIDOWYCH I ZWIĄZKÓW LIPIDOWYCH W SUROWICY KÓZ PODDANYCH SYNCHRONIZACJI RUI W ANESTRUS

Jan Udała, Dariusz Gączarzewicz, Tomasz Stankiewicz, Barbara Błaszczyk,
Krzysztof Garduła, Ewa Kuźniarka

*Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie*

Celem pracy było określenie stężeń progesteronu (P_4) i 17- β estradiolu (E_2) oraz cholesterolu całkowitego (CHOL), trójglicerydów (TG) i lipoprotein o niskiej (LDL) i wysokiej gęstości (HDL) w surowicy kóz rasy polskiej białej uszlachetnionej, u których w okresie anestrus przeprowadzono synchronizację rui. Badania wykonano na 8 kozach w czerwcu zakładając im gąbki dopochwowe Chronogest zawierające 20 mg cronolonu. Po 12 dniach gąbki usunięto i podano zwierzętom 500 j.m. PMSG (Folligon). Grupę kontrolną stanowiły 3 kozy. Krew do badań pobierano 6-krotnie: 1- przed założeniem gąbek, 2- w piątym dniu od ich założenia, 3- w dniu ich usunięcia, 4- w trzecim, 5- w siódmym i 6- w czternastym dniu od usunięcia gąbek.

Stężenie P_4 , gdy kozy miały założone gąbki nie podlegało większym zmianom (0,082 - 0,245 ng/ml w grupie D i 0,073 - 0,123 ng/ml w grupie K). Po kilku dniach od wyjęcia gąbek wystąpił gwałtowny wzrost stężenia tego hormonu, (8,99 ng/ml w dniu siódmym i 19,84 ng/ml w dniu czternastym). W grupie K stężenie hormonu nie zmieniło się. W przypadku stężenia E_2 zaobserwowano podobną dynamikę zmian w obu grupach, przy czym było ono generalnie wyższe w grupie K (17,72 pg/ml) niż D (16,54 pg/ml). Krzywa średnich stężeń E_2 w grupie D wykazywała charakterystyczny przebieg dla cyklu rujowego. Poziom CHOL przed doświadczeniem był podobny w obu grupach (D- 82,88 mg/dl i K- 81,67 mg/dl). W czasie całego okresu stymulacji obserwowano nieco wyższe stężenie CHOL u kóz D niż K. W ostatnich dwóch pobraniach wystąpiły relacje odmienne. Wyższą zawartość wskaźnika zanotowano w grupie K (74,00 mg/dl w 5. i 82,33 mg/dl w 6. pobraniu) niż w grupie D (odpowiednio 72,13 i 76,38 mg/dl). Średnia zawartość TG w grupie K wynosiła 23,83 mg/dl, a w grupie D, w której przez cały okres badań obserwowano wyższe wartości parametru, osiągnęła wartość 29,27 mg/dl. Ogólnie, stężenie HDL wyższe było u zwierząt K (58,17 mg/dl) niż D (54,75 mg/dl). Odwrotne relacje wystąpiły natomiast odnośnie LDL (D- 30,27 mg/dl, K- 26,78 mg/dl). Po usunięciu gąbek zaobserwowano obniżenie wartości obu lipoprotein co może być wynikiem zastosowanej stymulacji hormonalnej, prowadzącej w jajnikach do zmian w sekrecji hormonów steroidowych.

WPLYW INFUZJI TESTOSTERONU DO TĘTNICY JAJNIKOWEJ WE WCZESNEJ FAZIE PĘCZERZYKOWEJ U ŚWINI NA WYDZIELANIE HORMONÓW STEROIDOWYCH

Barbara Wąsowska, Stanisława Stefańczyk-Krzymowska

Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Okołojajnikowy kompleks naczyniowy, zlokalizowany w obszarze krezki naczyniowej jajnika, jest miejscem zwrotnego transferu hormonów jajnikowych z krwi żyłnej i limfy odpływającej z jajnika do krwi tętniczej zaopatrującej jajnik. Celem badań było sprawdzenie czy zwiększone stężenie testosteronu (T) we krwi docierającej do jajnika wywołuje dodatnie lub ujemne sprzężenia zwrotne i tą drogą wpływa na jego własne wydzielanie lub wydzielanie: progesteronu (P4), androstendionu (A4), 17 β -estradiolu (E2), estronu (E1).

Loszkom (n=4) infundowano T do tętnicy jajnikowej (TJ) po stronie doświadczalnej, przez 3 kolejne dni (16, 17, 18 dzień cyklu; DC) przez 6 godzin. Dawka T infundowana w 16 DC odpowiadała efektywności jego zwrotnego transferu tj. ilości hormonu przenoszonej zwrotnie do jajnika w czasie 1 min w tym stadium cyklu (dawka podstawowa). Tempo infuzji dawki podstawowej wynosiło 170.4 pg/min. W 17 DC infundowano dawkę podwójną, a w 18 DC potrójną. Po stronie kontrolnej infundowano NaCl. Próby krwi pobierano z obu żył jajnikowych codziennie (16-18 DC) w ciągu 3 godzin co pół godziny przed infuzją oraz po 2 godzinach od zakończenia infuzji przez 6 godzin co 1 godzinę. Wyniki zostały przedstawione jako zmiany stężenia hormonów w kolejnych etapach doświadczenia w stosunku do ich stężenia przed infuzją w pierwszym dniu doświadczenia, przyjętego jako 100%. Porównano stężenia hormonów uzyskane po infuzji T z ich stężeniami po stronie kontrolnej, testem dla danych niesparowanych (GraphPad Prism 5 Software, USA).

Infundowane do TJ dawki T spowodowały wzrost jego własnego wydzielania (dodatnie sprzężenie zwrotne): średnio o 135% po infuzji dawki podstawowej (P=0.02), o 113% po infuzji dawki podwójnej (P=0.04) oraz o 90% po infuzji dawki potrójnej (P=0.02). Ponadto infuzje T wywołały obniżenie wydzielania E1 o 234% (P=0.02) w 18 DC (ujemne sprzężenie zwrotne). Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w wydzielaniu P4, A4, E2.

Przeprowadzone badania wykazały funkcjonowanie sprzężeń zwrotnych pomiędzy pulą dostarczanego do jajnika T a jego własnym wydzielaniem oraz wydzielaniem E1. Wyniki te wskazują na funkcjonowanie lokalnych sprzężeń zwrotnych pomiędzy pulą T przenoszonego zwrotnie do jajnika a jajnikową steroidogenezą.

Badania finansowano z grantu KBN 3P06D 02323 oraz działalności statutowej IRZiBŻ PAN

**THE EFFECT OF GnRH, INHIBIN, ACTIVIN AND OVARIAN STEROID
ON THE EXPRESSION OF GENES CODING FOR PDYN, KAPPA
OPIOID RECEPTOR AND GNRH RECEPTOR IN VITRO BY
ANTERIOR PITUITARY CELLS OF CYCLIC GILTS**

Bartosz Wylot, Kinga Tworus, Stanisław Okrasa

*Department of Animal Physiology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn;
Oczapowski Street 1A, 10-719 Olsztyn-Kortowo*

Literature data indicate that dynorphins, deriving from prodynorphin (PDYN) and acting through *kappa* opioid receptors, are involved in a local modulation of gonadotropin secretion from anterior pituitary in females. Our previous studies have revealed changes in the expression of PDYN and *kappa* opioid receptor (KOR) genes in porcine anterior pituitaries across the estrous cycle. We have also demonstrated that *kappa* opioid receptor agonist has an inhibitory effect on LH and FSH secretion in anterior pituitary cells of cyclic gilts *in vitro*. However, data pertaining to the regulation of PDYN system activity in porcine pituitary are still rudimentary. Therefore, the aim of the present study was to determine *in vitro* effects of GnRH, CRH, activin, inhibin and ovarian steroids on the expression of genes coding for PDYN, KOR and GnRH receptor (GnRHR) in anterior pituitary cells of cyclic gilts. Anterior pituitaries (N=7) were obtained from gilts representing mid-luteal and late-follicular phase of the estrous cycle. Isolated cells were incubated with GnRH (100 ng/ml), CRH (10^{-8} and 10^{-7} M), inhibin (5 and 10 ng/ml), activin (5 and 10 ng/ml) and progesterone (30 ng/ml; in the luteal phase) or estradiol (25 and 50 pg/ml; in the follicular phase). The gene expression was determined by a semi-quantitative Real-Time PCR assay with the use of SybrGreen as a product detection system. Expression of PDYN gene in the luteal-phase pituitary cells was reduced after treatment with GnRH and it was increased after treatment with progesterone (30 ng/ml; $p < 0,05$). Additionally, expression of this gene was elevated in the cells, representing follicular phase, treated with CRH (10^{-7} M). GnRH increased expression of *kappa* opioid receptor gene in the luteal-phase pituitary cells and CRH (10^{-7} M) significantly elevated KOR mRNA level in both the follicular and luteal-phase pituitary cells. The stimulatory effect on the expression of GnRH receptor gene was observed in the pituitary cells from luteal-phase gilts, incubated with progesterone (30 ng/ml). The follicular-phase cells presented declined expression of GnRHR gene after treatment with GnRH (100 ng/ml), CRH (10^{-8} M, 10^{-7} M) and inhibin (5 ng/ml). These results indicate that the hypothalamic, ovarian and local pituitary factors may influence the expression of genes coding for GnRH receptor as well as prodynorphin and *kappa* opioid receptor in anterior pituitary cells of cyclic gilts.

This research was supported by the Ministry of Science and Higher Education (Project Nr N N303 292934) and by the European Union within the European Social Fund.

