

STRESZCZENIA SESJI PLENARNYCH

PLENARY SESSION ABSTRACTS

INTERFERONS AND PROGESTERONE FOR ESTABLISHMENT AND MAINTENANCE OF PREGNANCY: INTERACTIONS AMONG NOVEL CELL SIGNALING PATHWAYS

INTERFERONY I PROGESTERON W ROZPOZNANIU I UTRZYMANIU CIĄŻY: INTERAKCJE POMIĘDZY NOWYMI SZLAKAMI SYGNALIZACJI KOMÓRKOWEJ

Fuller W. Bazer

Center for Animal Biotechnology and Genomics, and Departments of Animal Science, Veterinary Integrative Biosciences, and Veterinary Physiology and Pharmacology, Texas A&M University, College Station, Texas 77843-2471

Type I and/or a Type II interferons (IFN) appear to be important in establishing uterine receptivity to implantation during the peri-implantation period of pregnancy in most mammals. These IFNs may induce, stimulate or inhibit expression of many genes, but most are IFN-stimulate genes (ISGs). Effects of IFNs range from pregnancy recognition signaling in ruminants through IFN tau (IFNT) to effects on cellular functions of the uterus and uterine vasculature. For most, if not all actions of IFNs, progesterone (P4) is permissive to expression of ISGs as some are induced directly by an IFN and others are induced by P4 and stimulated by an IFN in a temporal and/or cell-specific manner. Uterine receptivity to implantation is P4-dependent; however, implantation events are preceded by loss of expression of receptors for progesterone (PGR) and estrogen (ESR1) receptors by uterine epithelia. Therefore, P4 likely acts via PGR-positive stromal cells to induce expression of fibroblast growth factors-7 and -10, and/or hepatocyte growth factor (progestamedins) that act via their respective receptors on uterine epithelia and trophoctoderm to regulate expression of ISGs. Permissive effects of P4 on expression of ISGs and effects of P4 to induce and IFNs to stimulate gene expression suggest that uterine receptivity to implantation requires P4 and IFN to activate unique, but complimentary, cell signaling pathways. Uterine receptivity to implantation, depending on species, involves changes in expression of genes for attachment of trophoctoderm to uterine luminal and superficial glandular epithelia (LE/sGE), modification of phenotype of uterine stromal cells, silencing of PGR and ESR1 genes, suppression of genes for immune recognition, alterations in membrane permeability to enhance conceptus-maternal exchange of factors, increased vascularity of the endometrium, activation of genes for transport of nutrients into the uterine lumen, and enhanced signaling for pregnancy recognition. Differential expression of genes by uterine LE/sGE, glandular epithelium (GE) and stromal cells in response to P4 and IFNs likely influences uterine receptivity to implantation in most mammals. Our research with sheep indicates that IFNT abrogates the uterine luteolytic mechanism and stimulates expression of classical ISGs by GE and stromal cells. However, many P4-induced and IFNT-stimulated genes expressed only by LE/sGE that lack both PGR and STAT1 are important for uterine receptivity to implantation and conceptus development. These include wingless-type MMTV integration site family member 7A (WNT7A) induced by IFNT, as well as galectins, proteases, protease inhibitors, transporters for glucose and amino acids and hypoxia inducible factor that are induced by P4 and stimulated by IFNT. Understanding the roles of IFNs and ISGs in uterine receptivity for implantation is necessary to develop strategies to enhance reproductive health and fertility in humans and domestic animals.

INTERFERONY I PROGESTERON W ROZPOZNANIU I UTRZYMANIU CIĄŻY: INTERAKCJE POMIĘDZY NOWYMI SZLAKAMI SYGNALIZACJI KOMÓRKOWEJ

INTERFERONS AND PROGESTERONE FOR ESTABLISHMENT AND MAINTENANCE OF PREGNANCY: INTERACTIONS AMONG NOVEL CELL SIGNALING PATHWAYS

Fuller W. Bazer

*Center for Animal Biotechnology and Genomics, and Departments of Animal Science, Veterinary Integrative Biosciences,
and Veterinary Physiology and Pharmacology, Texas A&M University, College Station, Texas 77843-2471*

Interferony typu I i II okazały się ważnymi czynnikami biorącymi udział w powstawaniu gotowości macicy (tzw. receptywności macicy) do implantacji zarodka w peri-implantacyjnym okresie ciąży u większości ssaków. Interferony biorące udział w tym procesie mogą indukować, stymulować lub hamować ekspresję wielu genów ale w większości są to geny stymulowane przez interferony (ISGs – Interferon Stimulated Genes). Zakres działania interferonów obejmuje zarówno ich udział w procesie rozpoznania ciąży u przeżuwaczy poprzez działanie IFN-tau jak i oddziaływania na funkcje komórek macicy i jej unaczynienie. W większości, jeżeli nie we wszystkich oddziaływaniach interferonów, progesteron (P4) jest czynnikiem umożliwiającym ekspresję genów stymulowanych przez interferony ponieważ niektóre z nich są indukowane bezpośrednio przez interferon inne natomiast są indukowane przez P4 i stymulowane przez IFN w czasowo i/lub komórkowo zależny sposób.

Receptywność macicy jest zależna od progesteronu, jednakże implantacja jest poprzedzona utratą ekspresji receptorów dla progesteronu (PGR- ang. *Progesterone receptor*) i estrogenu (ESR1- ang. *Estrogen receptor 1*) w komórkach nabłonka macicy. Dlatego, prawdopodobnie progesteron indukuje w komórkach podścieliska (wykazujących obecność receptora dla progesteronu (PGR- dodatnie)) fibroblastyczny czynnik wzrostu -7 i -10 i/lub wątrobowy czynnik wzrostu (tzw. prostaglandyny), które z kolei oddziałują , poprzez swoje receptory na komórki nabłonka błony śluzowej macicy i trofoektodermi regulując ekspresję ISGs.

Sprzyjający wpływ P4 na ekspresję genów indukowanych przez interferon (ISGFs) i wpływ P4 na indukcję i interferonów na stymulację ekspresji genów wskazuje, że przygotowanie macicy do implantacji zarodka wymaga aktywacji odmiennych lecz komplementarnie działających ścieżek przekazywania sygnału, które są uruchamiane przez progesteron i interferon. Wrażliwość macicy na działanie sygnałów implantacyjnych w zależności od gatunku charakteryzuje się zmianami w ekspresji genów warunkujących przyleganie trofoektodermi do nabłonka wyścielającego światło macicy i nabłonka gruczołów powierzchownych (LE/sGE), modyfikacją fenotypu komórek podścieliska, wyciszeniem genów receptora progesteronowego i estrogenowego (ESR1), supresją genów zaangażowanych w procesy rozpoznania immunologicznego, zmianami w przepuszczalności błon komórkowych w celu wzmocnienia wymiany substancji pomiędzy matką i zarodkiem, zwiększonym unaczynieniem endometrium, aktywacją genów odpowiedzialnych za transport substancji odżywczych do światła macicy i wzmocnieniem sygnałów służących rozpoznaniu ciąży. Zróżnicowana ekspresja genów przez komórki nabłonka światła macicy i nabłonka gruczołów powierzchownych, nabłonka gruczołowego i komórek podścieliska w odpowiedzi na P4 i interferon prawdopodobnie wpływa na receptywność macicy u większości ssaków. Nasze badania prowadzone u owiec wskazują , że IFN-tau hamuje luteolizę wywołaną czynnikami pochodzenia macicznego i stymuluje ekspresję klasycznych genów stymulowanych przez IFN w komórkach nabłonka i podścieliska. Jednakże wiele genów indukowanych przez P4 i stymulowanych przez IFN-tau, które odgrywają ważną rolę w uzyskaniu receptywności macicy i rozwoju zarodka ulegają ekspresji tylko w komórkach nabłonka światła macicy i gruczołów powierzchniowych, które w tym czasie nie wykazują obecności zarówno receptora dla progesteronu jak i, i STAT1. Do tych genów należą WNT7A (wingless-type MMTV integration site family member 7A) indukowany przez IFN-tau a także galektyny, proteazy, inhibitory proteaz, białka transportowe dla glukozy i aminokwasów a także czynnik indukowany przez hipoksję (HIF) które są indukowane przez P4 i stymulowane przez IFN-tau. Rozpoznanie roli interferonów i genów stymulowanych przez interferony w procesach przygotowujących macicę do implantacji jest niezbędne w celu opracowania strategii poprawiających zdrowie reprodukcyjne u człowieka i zwierząt domowych.

FROM STEM CELLS TO MALE GERM CELLS

OD KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO GAMET MĘSKICH

Wolfgang Engel

*Institute of Human Genetics,
University of Göttingen, Heinrich-Düker-Weg 12,
37073 Göttingen, Germany*

Male gametes originate from a small population of Spermatogonial Stem Cells (SSCs). Recently, we were able to isolate SSCs from adult mouse testis and to demonstrate that these cells are pluripotent cells. Similar as Embryonic Stem Cells (ESC), SSCs could be differentiated into different cell types in vitro and into spermatozoa in vivo. We developed a strategy for the establishment of SSC lines and to differentiate haploid male germ cells in vitro. After injection of these cells into unfertilized oocytes and transfer of two-cell embryos into oviducts live mice were born. – Several research groups have shown that male germ cells can also be generated from ESCs in vitro. We have shown that these cells do not only undergo meiosis and become haploid, but are also functional spermatozoa. After fertilization of oocytes by intracytoplasmic sperm injection and transfer of two-cell stages into the female genital tract, mice were born. These mice showed a reduced life expectancy which is possible due to a global methylation defect of the DNA. – We were also able to generate SSCs line from pluripotent teratocarcinoma cells. Transplantation of the SSCs into testis of busulfan treated mice gave rise to spermatozoa. Spermatozoa were viable and functional, as shown by fertilization after intracytoplasmic sperm injection into mouse oocytes and the development of preimplantation embryos. First results on differentiation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells) from mouse fibroblasts are presented. – Till now we were not able to generate haploid male germ cells from Mesenchymal Stem Cells (MSCs). Our differentiation protocol which was successful with SSCs, ESCs and TCs, resulted in premeiotic cells only as deduced from the markers studied. – Our approach provides accessible in vitro model systems for studies of male gametogenesis and treatment of male infertility.

OD KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO GAMET MĘSKICH

FROM STEM CELLS TO MALE GERM CELLS

Wolfgang Engel

*Institute of Human Genetics,
University of Göttingen, Heinrich-Düker-Weg 12,
37073 Göttingen, Germany*

Gamety męskie powstają z małej populacji spermatogonicznych komórek macierzystych (ang. *Spermatogonial Stem Cells* - SSCs). Ostatnio udało się nam wyizolować komórki SSCs z jąder dojrzałej myszy oraz wykazaliśmy, iż są to komórki o zdolnościach wielokierunkowego różnicowania się. Podobnie jak embrionalne komórki macierzyste (ang. *Embryonic Stem Cells* ESC), komórki SSCs mogą różnicować w kierunku różnych typów komórek in vitro oraz w kierunku plemników in vivo. Opracowaliśmy strategię pozyskiwania linii komórek SSC oraz różnicowania haploidalnych gamet męskich in vitro. Po wstrzyknięciu tych komórek do niezapłodnionych oocytów oraz transferze dwukomórkowych embrionów do jajowodów rodziły się żywe myszy.

Kilka grup badawczych wykazało, iż męskie gamety można również otrzymywać in vitro z ESCs. Wykazaliśmy, iż te komórki nie tylko przechodzą mejozę i stają się haploidalne, ale są również funkcjonującymi plemnikami. Po zapłodnieniu oocytów przez docytoplazmatyczną iniekcję plemników i transfer dwukomórkowych embrionów do żeńskiego układu rozrodczego rodziły się myszy. Myszy te żyły krócej, co było prawdopodobnie związane z uogólnionymi błędami w metylacji DNA.

Osiągnęliśmy również możliwość generowania linii komórek SSCs z komórek potworniaków posiadających zdolność wielokierunkowego różnicowania. Przeszczepianie komórek SSCs do jąder myszy, którym podawano busulfan prowadziło do powstawania plemników. Plemniki były żywotne i funkcjonalne, co wykazała obecność zapłodnionych oocytów myszy po docytoplazmatycznej iniekcji plemników oraz uzyskanie embrionów w stadium przedimplantacyjnym.

Zaprezentowano wstępne wyniki różnicowania męskich gamet z indukowanych komórek macierzystych z fibroblastów myszy posiadających zdolność wielokierunkowego rozwoju (iPS cells). Do tej pory nie stwierdzono możliwości generowania haploidalnych komórek gamet męskich z mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *Mesenchymal Stem Cells* MSCs). Nasz protokół różnicowania, który przynosił rezultaty w przypadku komórek SSCs, ESCs oraz TCs, dawał efekt jedynie w postaci komórek premejotycznych, których obecność stwierdzano na podstawie badania markerów.

Nasze badania doprowadziły do uzyskania dostępnych in vitro modeli systemów badawczych nad męską gametogenezą oraz leczenia niepłodności męskiej.

THE FUTURE OF OBSTETRICS

PRZYSZŁOŚĆ POŁOŻNICTWA

Miriam Katz

Ben Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel

Prior to addressing the question of the future of Obstetrics allow me a brief review of the historic perspective of our unique specialty.

Unique, since it is the only one field in medicine that deals simultaneously with two patients, who's future is usually interdependent and only in extremely rare occasions is the true interest of the mother and her unborn baby at a conflict.

The capacity of the female body to bear children set women apart already in the prehistoric society, when venerated as deities-their godly tasks were always feminine- procreation, birth, rebirth. In ancient Egypt Hathor (the cow) was the mother of earth, in Rome -Juno protected pregnant women and nursing mothers. In Christianity the Virgin Mary is the mother of God. Although birthing was the exclusive domain of women it were the men – doctors – that were mesmerized by the conception and birth.

Hippocrates (450 BC) and later on Soranus (150 AC) described birth, the position of the fetus in the womb and dealt with the question of prematurity. The first textbook of Obstetrics and Gynecology published by Soranus was used to teach Obstetrics for over 1500 years. In spite of the fact that the Chamberlain's (1645) claimed that they invented the obstetric forceps we found in Soranus textbooks a picture of his first forceps. The advent of printing in the late 15th century led to a flurry of obstetrical literature. In 1513 a handbook by a German doctor Rössl named Rosengarden was published and became "the bible" for midwives and doctors up to the end of the 17th century.

In historical terms obstetrics is a rather recent addition to the medical profession. Until the 17th century childbirth was a social rather than medical event. Men were excluded from the chamber where birth occurred and birth was conducted by midwives who's role was part servants and part experts. With their equipment including a lamp, some warm water and sheets.

Only in cases in which serious complications arose, a doctor was called in. Knowing very little about normal labor and armed with the crudest instruments his job was usually confined to dealing with obstructive labor in mothers already.

In the 18th century with the advance in knowledge of anatomy, physiology the process of normal labor was described and major obstetric complication defined. That's when the three stages of labor and their management as well as the serious complications of third stage of labor related mainly to problems of placental separation were outlined.

The medical men of the 18th century were the first to address the question of high maternal mortality. They demanded that obstetrics will be regarded as a new and important addition to the field of orthodox medicine. As a result they begun taking over the care for pregnant women and in effect pushed aside the traditional midwife.

In spite of these developments maternal mortality remained very high until in the early 19th century Semmelweis (1847) introduced the concept of antisepsis and asepsis as means to battle "birth fever". This was the first dramatic step in reduction of maternal mortality.

To further reduce maternal and infant mortality, in the beginning of the 20th century an effort was made to bring all childbearing women under the supervision of surgically trained doctors. Joseph De Le, one of the leading figures in 20th century obstetrics, stated in 1950:

" The parturient suffers under the old prejudice that labor is a physiological act, and the medical profession entertains the same prejudice, while as a matter of fact, obstetrics has great pathologic dignity – it is a major science of the same rank as surgery ".

Birth as surgical procedure was under his influence divided into two separate stages.

One in which the mother labored and the second in which the doctor delivered. Bizarre as it may sound, this conception is still accepted in many delivery rooms today. The delivery rooms, sterile, with special clothing and special trained personnel with the physician as the "captain" of the ship isolates the woman in labor from her natural surroundings and treats her as an ill patient and not as a person undergoing a

physiological process of labor, which in the majority of cases will be normal and does not require medical intervention.

All this is done in the name of mother's and child's safety and well-being even in cases where everything is normal.

The 20th century has seen astonishing progress in obstetrics: Antibiotics, blood transfusion, modern anesthesia, made delivery quite safe, reducing maternal and fetal mortality 50-95 times.

By the 1960's Jan Donald introduced ultrasonography and with the progress of technology it is today impossible to imagine modern obstetrics without it.

In the late 60's Hon introduces the continuous fetal monitoring which – generally beneficial – lead to an exponential rise of unnecessary cesarean section, once more proving that some of the best tools may be misused.

During the last 25 years developments in genetics, ultrasonography and increased availability of fetal treatment options led to the development of the concept of the fetus as a patient.

The practice of obstetrics today thrives to be evidence based rather than opinion based. This has its good and bad sites .

Gone is the all knowing "Big Boss " who could order you to do what he wishes –because he is the boss–even if you did not agree with his judgment –and this is very good.

Doctors are forced to act according to accepted protocols based on these evidence -based studies and cannot independently implement common sense practice in fear of litigation in case that anything goes wrong –and it may.–and this is not always in the benefit of the patient.

Unfortunately in spite of all progress it is obvious that we are not able to succeed by 100%. Today's obstetric practice is effected and not in a positive way, by the professional liability crisis on one hand and by the impact of feminist movement on the other.

Growing and vocal groups of women protest against the medicalization of normal labor, questioning the importance of ultrasound, monitoring, pH estimates and widespread use of labor induction and cesarean section.

They claim that the 20th century obstetrics took labor control from the woman and her matriarchal support system and placed it in the hands of the patriarchal world of medicine.

This is with no doubt true but this is only one side of the story since they tend to forget that as a result of all mentioned above the maternal and fetal mortality are currently a rare occurrences in modern delivery rooms.

What will be the main forces that will shape the obstetric practice in the 21st century? Most probably there will be the following :

- 1-the direction of the professional liability crisis
- 2-medical practice and research competition
- 3-ethical issues arising from technological and social imperatives
- 4-the changing gender profile of the specialty
- 5-the impact of the feminist movements on women's health care

The truth should be said that the delivery room today, equipped with all modern armamentarium is cold and impersonal and therefore the drive for home style delivery rooms within the hospital premises seems to be the right direction.

The women giving birth to day tend to be " in between" a belief in the integrity of nature and a trust in the power of technology.

More then ever before –birth is at the cross road ,one in which the mostly natural, matriarchal community system of the 16 to 19 centuries is intersecting with the sophisticated ,mostly technological system of the twentieth century .

Will birth return to the home under the guidance of midwives or will there be a more physiologic and less medicated approach to the healthy ,normal parturient –apparently both of them are now happening throughout much of the world.

We just must be careful not to over due it .

Will the advancing technology take birth to the other extreme, making it possible to eventually gestate outside the uterus ,and rendering "delivery" a term not referring to passage through the birth canal ,but to the dropping off a healthy term baby at the mother's doorsteps? Let's hope that this will not happen but no one for sure can predict the future .

No one can predict what will occur ,but whatever that may be, hindsight will likely point to the 21 century as the beginning of a new paradigm for birth –and it should make for an interesting future.

THE FUTURE OF OBSTETRICS

PRZYSZŁOŚĆ POŁOŻNICTWA

Miriam Katz

Ben Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel

Szanowni Państwo,

Zanim przejdę do właściwego tematu mojego wystąpienia, czyli przyszłości położnictwa, chciałabym przestawić krótki przegląd historii naszej wyjątkowej specjalizacji.

Prehistoryczne społeczeństwa, które czciły boginie opiekunki prokreacji, porodu, odrodzenia, tym samym uznawały nadzwyczajną możliwość żeńskiego ciała do rodzenia. W starożytnym Egipcie bogini Hather (w kształcie krowy) była symbolem matki ziemi; w Rzymie Juno chroniła ciężarne kobiety i matki karmiące. Dla chrześcijaństwa niezwykłą rolę odgrywa Maria dziewica, Matka Boska. Gdy rodzeniem zajmowały się kobiety, to mężczyźni byli zafascynowani poczęciem i porodem.

Najpierw Hipokrates (450 p.n.e) a po nim Soranus (150 n.e.) opisali proces rodzenia, ułożenie płodu w łonie a nawet podjęli dyskusję na temat przedwczesnych porodów. Pierwszy podręcznik na temat położnictwa i ginekologii wydany przez Soranusa służył przez ponad 1500 lat! Warto zaznaczyć, że choć Chamberlain w 1645 twierdził, że wynalazł kleszcze, to w podręczniku Soranusa można znaleźć rysunek jego pierwszych kleszczy.

Nowa technologia druku, która powstała na końcu 15go wieku sprzyjała wydaniu nowych źródeł o ginekologii. W 1513 roku niemiecki lekarz Rosengarten z Rösslin wydał podręcznik, który został przez długie lata bo aż do końca 17go wieku, „biblią” dla położnic i lekarzy.

W perspektywie historycznej, położnictwo tak naprawdę jest stosunkowo nową dziedziną. Poród do 17go wieku były raczej wydarzeniem towarzyskim niż medycznym. Mężczyźni nie mieli dostępu do izby porodowej a poród odbierała położna, która pełniła rolę po części służącej po części eksperta. Przez wieki podstawowy sprzęt przy porodzie to była lampa, gorąca woda i pościel. Lekarza ściągano tylko w bardzo skomplikowanych przypadkach. Ówczesny medyk miał bardzo prymitywną wiedzę o normalnym procesie porodowym, jeszcze bardziej prymitywny sprzęt a jego rola zwykle ograniczała się do udzielania najprostszej pomocy przy skomplikowanych porodach.

Dopiero w 18tym wieku widzimy pierwsze znaczące postępy w wiedzy o anatomii i fizjologii, dopiero wtedy został opisany proces normalnego porodu jak również powstały opisy podstawowych komplikacji położniczych. To w tym okresie poznano i opisano trzy podstawowe okresy porodu, kierowaniem nimi oraz poważne komplikacje trzeciego okresu porodu powstające przeważnie z powodu odklejenia łożyska.

Lekarze 18to-wieczni byli pierwsi, którzy zwrócili uwagę na problem wysokiej śmiertelności macierzyńskiej. Żądali, aby położnictwo zostało uznane przez medycynę ortodoksyjną jako nowa i pełnoprawna dziedzina. Wynikiem ich działalności było przejęcie przez lekarzy opieki nad ciężarnymi oraz prawie całkowite odsunięcie położnic od rodzących matek. Jednak dalej śmiertelność była bardzo wysoka. Sytuacja nieco się poprawiła dopiero na początku 19go wieku, gdy Semmelweis (1847) wprowadził pojęcie antysepsy i asepsy (antyseptyki i aseptyki) jako sposób zwalczania gorączki połogowej. To był pierwszy poważny krok w zmniejszaniu poziomu śmiertelności macierzyńskiej. Na początku dwudziestego wieku postanowiono objąć wszystkie ciężarne kobiety opieką wyspecjalizowanych lekarzy co spowodowało kolejne znaczące obniżenie poziomu śmiertelności matek jak i również noworodków. Joseph De Le, jeden z czołowych lekarzy położnictwa w dwudziestym wieku, stwierdził 1 1950 roku, że

„Rodząca ulega starym uprzedzeniom, że połóg to czynność fizjologiczna, co również ulega cała profesja medyczna. Prawdą jednak jest, że położnictwo ma swą wielką patologiczną dumę ponieważ jest nauką tej samej rangi co chirurgia.”

Pod jego wpływem poród jako procedura chirurgiczna została podzielona na dwa stadia. Pierwszy stadion to połóg ciężarnej, a drugi to odbiór porodu przez lekarza. Choć to może wydawać się niemożliwe, ta koncepcja porządku porodu dalej funkcjonuje we wielu izbach porodowych. Dalej obowiązuje schemat sterylnej porodówki gdzie, w obecności specjalistycznego personelu w specjalnej odzieży razem z lekarzem jako „kapitanem” tej załogi, kobieta jest izolowana od własnego porodu,

traktowana jest jako chora a nie osoba przechodząca fizjologiczny proces porodu, proces który w większości wypadków przebiega normalnie i nie wymaga interwencji lekarskiej. Jednak wszystko to przebiega w głębokiej wierzy, że jest to dla dobra matka i dziecka nawet wtedy kiedy wszystko przebiega bez komplikacji.

Dwudziesty wiek to okres wielkich postępów w położnictwie: antybiotyki, transfuzje krwi, nowoczesna anestezja, wszystko to sprawiło, że poród stał się bezpieczny i równocześnie zmniejszyło ryzyko śmiertelności macierzyńskiej i płodowej od 50 do 95 procent.

Jan Donald wprowadził ultrasonografię w lata 60tych i już dzisiaj nie sposób wyobrazić sobie nowoczesne położnictwo bez tego oraz wielu innych wynalazków technologicznych. Jednak w późnych latach 60tych, Hon wprowadził stałe monitorowanie płodu co z jednej strony przydatne jednak z drugiej strony doprowadziło do nadmiaru niepotrzebnych cięć cesarskich co kolejny raz dowodzi że nawet najlepszy sprzęt może być nadużywany. Przez ostatnie 25 lat, byliśmy świadkami niesamowitego postępu w dziedzinach genetyki, ultrasonografii oraz w leczeniu płodu. Wszystko to razem pozwoliło na nowe podejście do płodu jako pacjenta.

Nowoczesne położnictwo stara się być oparte na faktach raczej niż na przypuszczeniach, co ma swoje wady i zalety. Na szczęście zniknął wszech-wiedzący i wszech-mogący SzeF, który nie tolerował sprzeciwu. Dzisiaj lekarzy są zmuszeni działać według protokołów ściśle opartych na badaniach i już nie mogą niezależnie działać według swojego zdrowego rozsądku w obawie przed sądem jeśli coś poszłoby nie tak. Jednak to też nie zawsze jest w najlepszym interesie pacjenta.

Mimo całego ogromnego postępu nigdy nie można mówić o stu-procentowym poziomie sukcesu. Współczesne położnictwo jest w pewnym sensie ofiarą kryzysu odpowiedzialności zawodowej oraz do pewnego stopnia środowisk feministycznych. Grupy feministek coraz głośniejsze protestują przeciwko nadmiernej ingerencji lekarzy w porodach o normalnym przebiegu, kwestionują potrzebę badań ultradźwiękowych, monitoringu, oceny odczynu pH oraz powszechne stosowanie indukcji porodowej oraz cesarskich cięć. Są przekonane, że w dwudziestym wieku położnictwo odebrało kobietom kontrolę nad własną ciążą i odsunęło ją od systemu wsparcia matriarchalnego, zostawiając je zupełnie uzależnione od patriarchalnego świata medycyny nowoczesnej. O ile jest w tym dużo racji, to jednak z drugiej strony często zapomina się, że dzięki wszystkim tym zmianom śmiertelność macierzyńska i płodowa w porodówce jest coraz rzadszym zjawiskiem.

Jakie będą główne siły kształtujące położnictwo w 21ym wieku?

Wydaje mi się, że można je streścić następująco:

1. kierunek rozwoju kryzysu odpowiedzialności zawodowej
2. praktyka lekarska i konkurencja badaniowa
3. zagadnienia etyczne wynikające z technologicznych oraz społecznych imperatyw
4. większy nabór kobiet do specjalizacji
5. wpływ ruchu feministek na strukturę opieki zdrowotnej dla kobiet

Prawdą jest, że dzisiejsza porodówka, wypełniona nowoczesnym armamentarium, jest zimna i sterylna. Naciska na większy komfort i bardziej „domowe” otoczenie na terenie szpitali jest na pewno słuszny. Kobiety rodzące w naszych czasach muszą pogodzić wiarę w integralność przyrody z zaufaniem do nowych technologii.

Jak nigdy wcześniej, poród odbierany jest na skrzyżowaniu świata opieki matriarchalnej z czasów 16go do 19go wieku a świata „high-tech” 21go wieku.

Pytanie jest czy porody wrócą pod opiekę położnic i czy podejście do zdrowej rodzącej stanie się bardziej fizjologiczny z mniejszą ingerencją lekarską. Na pewno zmiany zachodzą w obu tych kierunkach na całym świecie. Abyśmy nie przesadzili.

A może coraz bardziej postępująca technologia w ogóle spowoduje, że ciąża będzie kiedyś odbywała się całkowicie poza macicą a „poród” nie będzie oznaczać przejście przez kanał porodowy lecz dostawę zdrowego dziecka do domu matki. Nie życzyłabym nikomu takiego scenariusza, lecz nie mamy pewności co do przyszłości.

EARLY POST-IMPLANTATION PREGNANCY IN THE DOG - PHYSIOLOGICAL FEATURES AND CHANGES RELATED TO PROGESTERONE WITHDRAWAL

OKRES POST-IMPLANTACYJNY WE WCZESNEJ CIAŻY PSÓW - ZJAWISKA FIZJOLOGICZNE I ZMIANY ZWIĄZANE Z OBNIŻENIEM STĘŻENIA I AKTYWNOŚCI PROGESTERONU

AR Günzel-Apel

*Unit for Reproductive Medicine of Clinics - Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine, Foundation,
Bünteweg 15, 30559 Hannover, Germany, phone: +49 511 953 8526, FAX +49 511 953 828526*

Considering pregnancy as a stable condition, its beginning may be correctly dated at the time of implantation occurring 22 to 23 after the LH-surge or about 19 to 21 days after ovulation (ov). As implantation is the prerequisite for early pregnancy detection by analysis of serum relaxin concentrations and pre-implantation embryos may be detectable by high resolution ultrasound imaging not before day 17 after ov, loss of pre-implantation embryos cannot be diagnosed under clinical conditions. Considering this, early pregnancy as well as early pregnancy loss should be related to the post-implantation period of gestation between day 20 and 28 (to 30) after ov. Pregnancy failure occurring during this stage of gestation is characterized by embryonic death followed by resorption, which may not be perceived unless ultrasound examinations are performed.

Termination of early post-implantation pregnancy by $\text{PGF}_{2\alpha}$ or -analogues alone or in combination with a dopamine agonist has been demonstrated to be a process of several days, during which almost completely resorbed placental sites are observed beside live fetuses in different uterine locations. Similarly delayed processes of embryonic death and resorption are induced by the progesterone receptor blocking agent aglepristone.

Subcutaneous aglepristone application in early pregnancy (10 mg/kg d 24 and 25 after ov) led to forced luteal regression after d 35 after ov, while under luteolytic medication (cloprostenol 1.0 $\mu\text{g/kg}$ sc d 24 and 27 after ov in combination with the dopamine agonist cabergoline 5.0 $\mu\text{g/kg}$ po daily from d 24 to 30 after ov) a sharp drop in progesterone (P_4) concentrations immediately after start of treatment followed by a continuous further decrease until d 60 was observed. In bitches treated with aglepristone, concentrations of prolactin (PRL), the main luteotropic factor in dogs, increased similarly as in control bitches but started to decline concomitant with the falling P_4 concentrations. Application of cabergoline clearly suppressed PRL secretion from the start of treatment. Relaxin concentrations did not show direct changes under both treatments, but dropped markedly coinciding with death of the last fetuses.

Fibrinogen concentrations and activities of plasminogen and α -plasmin inhibitor are significantly increased during post-implantation pregnancy when compared with non pregnant bitches, indicating activation of the coagulation system caused by epithelial and endothelial alteration during placentation. These patterns remained almost completely unaffected during early post-implantation pregnancy termination.

In the sonographically intact embryos/fetuses heart rates increased moderately until mid gestation and remained constant (mean 235 BPM) as long as pregnancy was maintained. A clear decrease in heart rate prior to embryonic death could be realized in only one conceptus of three bitches each 30 to 120 min before fetal death. Compared with physiological conditions, blood flow patterns in small utero-placental vessels of intact placental sites showed only slight changes in both treatment groups. Progressing resorption was accompanied by local reduction of uterine perfusion rendering differentiation of vessels more and more difficult.

Under additional consideration of morphological criteria of resorption sites these results demonstrate that embryonic/fetal death may be a consequence of local progesterone deficiency followed by placental disintegration. The latter was accompanied by decreasing relaxin concentrations after death

of the last fetus. For elucidation of the causal background of asynchrony in occurrence of embryonic death and progress of placental disintegration further input in placental research is needed.

References

- Bunck CF, Mischke R, Günzel-Apel AR. Investigation of the fibrinolytic system during nonpregnant and pregnant oestrous cycles of bitches. *J Reprod Fertil* 2001;Suppl 57:207-214
- Concannon PW, Gimpel T, Newton L, Castracane VD. Postimplantation increase in plasma fibrinogen concentration with increase in relaxin concentration in pregnant dogs. *Am J Vet Res* 1994;57:1382-1385
- Concannon P, Tsutsui T, Shille V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J Reprod Fertil* 2001;Suppl 57:169-179
- Di Salvo P, Bocci F, Zelli R, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci* 2006;81:382-388
- Galac S, Kooistra HS, Butinar J, Bevers MM, Dieleman SJ, Voothout G, Okkens AC. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology* 2000;53:941-950
- Lange K, Günzel-Apel AR, Hoppen HO, Mischke R, Nolte I. Effects of low doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the early luteal phase before and after implantation in beagle bitches. *J Reprod Fertil* 1997;Suppl 51:251-257
- Onclin K, Silva LDM, Verstegen JP. Termination of unwanted pregnancy in dogs with the dopamine agonist, cabergoline, in combination with a synthetic analog of $PGF_{2\alpha}$, either cloprostenol or alphaprostol. *Theriogenology* 1995;43:813-822
- Steiger K, Politt E, Hoeftmann T, Meyer-Lindenberg A, Schoon HA, Günzel-Apel AR. Morphology of canine placental sites after induced embryonic or fetal death. *Theriogenology* 2006;66:1709-1714

OKRES POST-IMPLANTACYJNY WE WCZESNEJ CIĄŻY PSÓW - ZJAWISKA FIZJOLOGICZNE I ZMIANY ZWIĄZANE Z OBNIŻENIEM STĘŻENIA I AKTYWNOŚCI PROGESTERONU

EARLY POST-IMPLANTATION PREGNANCY IN THE DOG - PHYSIOLOGICAL FEATURES AND CHANGES RELATED TO PROGESTERONE WITHDRAWAL

AR Günzel-Apel

*Unit for Reproductive Medicine of Clinics - Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine, Foundation, Bünteweg
15, 30559 Hannover, Germany, phone: +49 511 953 8526, FAX +49 511 953 828526*

Zakładając, że ciąża jest zjawiskiem w którym kolejne etapy przebiegają w sposób uporządkowany, w określonej kolejności, jej początek można precyzyjnie określić na podstawie momentu implantacji tj. 22-23 dnia po wyrzucie LH lub 19-21 dnia po owulacji (ov). Ponieważ, implantacja jest warunkiem rozpoznania ciąży na podstawie oznaczenia stężenia relaksyny w surowicy krwi a z kolei obecność zarodków w stadium przedimplantacyjnym nie jest wykrywana w badaniu USG przed 17 dniem po owulacji, wcześniejsza utrata ciąży, warunkach klinicznych nie jest diagnozowana. Biorąc to pod uwagę, określenie wczesnej ciąży lub utrata wczesnej ciąży zachodzące w tym okresie, winna być odnoszona do okresu post- implantacyjnego tj. od 20 do 28 (nawet 30) dnia po owulacji. Utrata ciąży w tym okresie charakteryzuje się śmiercią zarodków i ich resorpcją, co może nie być zauważone bez przeprowadzenia badania USG.

Wykazano, że przerwanie wczesnej ciąży w okresie post- implantacyjnym wskutek podania PGF_{2α} lub jej analogów pojedynczo lub w terapii skojarzonej z agonistami dopaminy jest procesem trwającym kilka dni, w przebiegu którego obserwuje się całkowitą resorpcję miejsc implantacyjnych z jednoczesną obecnością żywych płodów umiejscowionych w różnych częściach macicy. Podobnie opóźniony proces obumierania zarodków i ich resorpcji stwierdza się po podaniu aglepristonu – czynnika blokującego receptor progesteronowy.

Podskórne podanie aglepristonu we wczesnej ciąży (10mg/kg w 24 i w 25 dniu po owulacji) prowadzi do wymuszonej regresji ciała żółtego po 35 dniu po owulacji, podczas gdy podanie preparatów luteolitycznych (cloprostenol 1.0 µg/kg sc w 24 i 27 dniu po owulacji w kombinacji z agonistą dopaminy cabergoline 5.0 µg/ kg per os codziennie od 24 do 30 dnia po owulacji) powoduje gwałtowny spadek stężenia progesteronu (P₄) natychmiast po rozpoczęciu terapii z utrzymującym się obniżonym poziomem do 60 dni. U suk leczonych aglepristonem, stężenie prolaktyny (PRL), głównego czynnika luteotropowego u psów, wzrastało podobnie jak u suk kontrolnych, jednak spadek stężenia prolaktyny obserwowano wraz ze spadkiem stężenia P₄. Podania cabergoline wyraźnie obniżało sekrecję prolaktyny od początku terapii. Oba sposoby leczenia nie zmieniały bezpośrednio stężenia relaksyny ale jej poziom znacząco się obniżał wraz ze śmiercią ostatniego płodu.

Stężenie fibrynogenu i aktywność plazminogenu i inhibitora α-plazminy znacząco wzrastają w post-implantacyjnym okresie ciąży u suk w porównaniu z sukami nie będącymi w ciąży, co wskazuje na aktywację układu krzepnięcia spowodowanej przez zmiany w komórkach nabłonka i endotelium w procesie implantacji. Te parametry pozostawały prawie całkowicie nie zmienione podczas farmakologicznego zakończenia ciąży w okresie post-implantacyjnym.

W prawidłowych, w badaniu sonograficznym, zarodkach/ płodach liczba uderzeń serca wzrasta stopniowo aż do połowy ciąży i pozostaje stała (średnio 235 uderzeń na minutę) w dalszym przebiegu ciąży. Wyrażne obniżenie akcji serca przed śmiercią zarodkową można było zaobserwować tylko u jednego płodu u każdej z 3 badanych suk w około 30 -120 minut przed śmiercią płodu. W porównaniu z fizjologicznie przebiegającą ciążą, przepływ krwi w małych naczyniach maciczo-łożyskowych w niezmienionych miejscach implantacyjnych wykazywał tylko nieznaczne zmiany w obu grupach doświadczalnych. Postępującej resorpcji towarzyszyło miejscowe ograniczenie perfuzji macicy, które coraz bardziej utrudniało różnicowanie naczyń.

Uwzględniając dodatkowo kryteria morfologicznej oceny miejsc resorpcyjnych te wyniki wskazują, że śmierć zarodkowo/płodowa może być skutkiem lokalnego niedoboru progesteronu z następującą dezintegracją łożyska. Z kolei procesowi dezintegracji towarzyszy obniżenie stężenia relaksyny po śmierci ostatniego płodu. Konieczne są dalsze badania nad łożyskiem u psów w celu wyjaśnienia przyczyn asynchronii zachodzącej pomiędzy śmiercią zarodków i tempem dezintegracji łożyska.

References:

- Bunck CF, Mischke R, Günzel-Apel AR. Investigation of the fibrinolytic system during nonpregnant and pregnant oestrous cycles of bitches. *J Reprod Fertil* 2001;Suppl 57:207-214
- Concannon PW, Gimpel T, Newton L, Castracane VD. Postimplantation increase in plasma fibrinogen concentration with increase in relaxin concentration in pregnant dogs. *Am J Vet Res* 1994;57:1382-1385
- Concannon P, Tsutsui T, Shille V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J Reprod Fertil* 2001;Suppl 57:169-179
- Di Salvo P, Bocci F, Zelli R, Polisca A. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci* 2006;81:382-388
- Galac S, Kooistra HS, Butinar J, Bevers MM, Dieleman SJ, Voothout G, Okkens AC. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology* 2000;53:941-950
- Lange K, Günzel-Apel AR, Hoppen HO, Mischke R, Nolte I. Effects of low doses of prostaglandin $F_{2\alpha}$ during the early luteal phase before and after implantation in beagle bitches. *J Reprod Fertil* 1997;Suppl 51:251-257
- Onclin K, Silva LDM, Verstegen JP. Termination of unwanted pregnancy in dogs with the dopamine agonist, cabergoline, in combination with a synthetic analog of $PGF_{2\alpha}$, either cloprostenol or alphaprostol. *Theriogenology* 1995;43:813-822
- Steiger K, Politt E, Hoeftmann T, Meyer-Lindenberg A, Schoon HA, Günzel-Apel AR. Morphology of canine placental sites after induced embryonic or fetal death. *Theriogenology* 2006;66:1709-1714

POSSIBLE ROLES OF HYPOXIA IN LUTEAL FORMATION AND REGRESSION IN CATTLE

MOŻLIWY UDZIAŁ HIPOKSJI W POWSTAWANIU I REGRESJI CIAŁKA ŻÓŁTEGO U BYDŁA

Kiyoshi OKUDA

Laboratory of Reproductive Endocrinology, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

Luteolysis is characterized by a decrease in progesterone (P4) production (functional luteolysis), followed by a decrease in luteal size (structural luteolysis), during which cells of the corpus luteum (CL) undergo apoptosis. We have recently provided evidences for importance of low oxygen conditions (hypoxia) in luteolysis in cattle. These studies revealed that hypoxia inhibited P4 synthesis [1] and induced luteal cell death [2], suggesting that oxygen deficiency is one of the major factors contributing to both functional and structural luteolysis in cattle.

Angiogenesis is known to occur during development of CL in many species including cattle. During this decade, hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) has been recognized to have critical roles in angiogenesis via transcriptional regulation of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF). HIF1 is an obligatory heterodimeric protein composed of two members of the basic-helix-loop-helix (bHLH)-containing PER-ARNT-SIM (PAS) domain family, HIF1A (alpha subunit) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) [3]. Whereas ARNT expression is not regulated by hypoxia, HIF1A is stabilized only under hypoxic conditions [4-6]. We recently obtained the following findings: mRNA expression of HIF1A was down-regulated at the regressed stage, while protein expression of HIF1A was the highest at the early luteal stage and decreased at the latter stages. VEGF expression was the highest at the developing luteal stage in both mRNA and protein levels. Hypoxia increased the amounts of HIF1A protein, VEGF mRNA and protein in bovine luteal cells. The above findings indicate that HIF1 is essential for the VEGF-induced angiogenesis during luteal development, and suggest that hypoxia formed after a follicle rupture is important for formation of luteal vasculature in cattle. Based on the overall findings and our recent reports, we conclude that hypoxia is an important condition for both luteal formation and regression in cattle.

- [1] Nishimura et al. *Endocrinology* 147, 4273-4280 (2006)
- [2] Nishimura et al. *Biol Reprod* 78, 529-536 (2008)
- [3] Wang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-5514 (1995)
- [4] Salceda and Caro. *J Biol Chem* 272, 22642-22647 (1997)
- [5] Huang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992 (1998)
- [6] Kallio et al. *J Biol Chem* 274, 6519-6525 (1999)

MOŻLIWY UDZIAŁ HIPOKSJI W POWSTAWANIU I REGRESJI CIAŁKA ŻÓŁTEGO U BYDŁA

POSSIBLE ROLES OF HYPOXIA IN LUTEAL FORMATION AND REGRESSION IN CATTLE

Kiyoshi OKUDA

Laboratory of Reproductive Endocrinology, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

Luteoliza charakteryzuje się spadkiem produkcji progesteronu (P4) (luteoliza funkcjonalna), po której następuje zmniejszanie się rozmiarów ciała żółtego (luteoliza strukturalna), podczas którego dochodzi do apoptozy komórek w ciałku żółtym (CL). Ostatnio uzyskane przez nas wyniki dostarczają dowodów świadczących o istotnej roli niskiego stężenia tlenu (hipoksji) w procesie luteolizy u bydła. Badania te wykazały, iż niedotlenienie hamuje wytwarzanie P4 [1] oraz indukuje śmierć komórek lutealnych [2], co sugeruje iż niedobór tlenu jest jednym z głównych czynników biorących udział zarówno w funkcjonalnej jak i strukturalnej luteolizie u bydła.

U wielu gatunków zwierząt, w tym bydła, rozwojowi ciała żółtego towarzyszą procesy angiogenezy. W trakcie tej dekady wykazano istotną rolę czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF1, *ang. hypoxia-inducible factor 1*) w procesach angiogenezy. Czynniki te mają zdolność regulacji, na drodze transkrypcyjnej, czynników proangiogennych, takich jak naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonnka (VEGF, *ang. vascular endothelial growth factor*). HIF1 jest obligatoryjnym, heterodimerskim białkiem złożonym z dwóch członów typu bHLH (*ang. basic-helix-loop-helix*) - zawierających domenę z rodziny PER-ARNT-SIM (PAS), HIF1A (podjednostki alfa) oraz białka ARNT (*ang. aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) [3]. Podczas gdy ekspresja ARNT nie jest regulowana przez niedotlenienie, do stabilizacji HIF1A dochodzi w warunkach niedotlenienia [4-6]. Ostatnio uzyskaliśmy następujące wyniki: w stadium regresji dochodziło do zmniejszania ekspresji mRNA dla HIF1A, podczas gdy ekspresja białek HIF1A była najwyższa we wczesnej fazie lutealnej i zmniejszała się w późniejszych etapach. Ekspresja VEGF była najwyższa w trakcie rozwoju fazy lutealnej, zarówno na poziomie mRNA jak i białka. W komórkach lutealnych krów hipoksja prowadziła do wzrostu ilości białka HIF1A, a także wzrostu ilości VEGF na poziomie mRNA i białka. Powyższe wyniki wskazują, iż HIF1 pełni istotną rolę w indukowanej przez VEGF angiogenezie w trakcie powstawania ciała żółtego oraz sugerują, iż niedotlenienie występujące po pęknięciu pęcherzyka ma ważny wpływ na rozwój unaczynienia ciała żółtego u bydła. W oparciu o dostępne wyniki badań oraz nasze ostatnie wyniki, można wyciągnąć wnioski, iż niedotlenienie jest ważnym czynnikiem zarówno w trakcie formowania, jak i regresji ciała żółtego u bydła.

- [1] Nishimura et al. *Endocrinology* 147, 4273-4280 (2006),
- [2] Nishimura et al. *Biol Reprod* 78, 529-536 (2008),
- [3] Wang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-5514 (1995),
- [4] Salceda and Caro. *J Biol Chem* 272, 22642-22647 (1997),
- [5] Huang et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7987-7992 (1998),
- [6] Kallio et al. *J Biol Chem* 274, 6519-6525 (1999)

STRESZCZENIA SESJI TEMATYCZNYCH

THEMATIC SESSION ABSTRACTS

S E S J A I

Biologiczne uwarunkowania procesów spermatogenezy

Biologia i ocena nasienia cz. I

S E S S I O N I

Biological conditioning of spermatogenesis processes

Biology and evaluation of sperm - part I

SPECYFICZNE UWARUNKOWANIA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO NA TERENIE JĄDRA U SSAKÓW

SPECIFIC IMMUNE ENVIRONMENT IN MAMMALIAN TESTIS

Maciej Kurpisz, Natalia Rozwadowska, Małgorzata Białas

Instytut Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, e-mail: kurpimac@man.poznan.pl

Cel pracy: Wykazanie uprzywilejowanego immunologicznie środowiska w gonadzie męskiej ssaków poprzez oznaczanie ilościowe cytokin (IL-1-IL18, IL-6, IL-10, TNF) w różnych stanach patologicznych jądra, w porównaniu do fizjologicznej spermatogenezy.

Materiał i metody: Badano populacje rozfrakcjonowanych komórek prawidłowej gonady; tj. śródmięsza oraz komórek gametogenicznych oraz homogenizowany materiał biologiczny (RNA) z oligobiopsji jąder w różnych stanach patologicznych gonady: azoospermii obstrukcyjnej (AO), bloków spermatogenezy na wczesnych etapach (MA), stadium spermatocyta (Spc), spermatydy (Sp), zespołu samych komórek Sertolego (SCOS) oraz nowotworów gonady, głównie seminoma (S). Stosowano ekstrakcje RNA metodą izotiocyanianu guanidyny oraz ocenę ilościową ekspresji genu metodą PCR w czasie rzeczywistym. W gonadzie mysiej, analizowano bloki spermatogenezy występujące na podłożu genetycznym oraz z powodu czynników egzogennych, tj. cis-platyny, busulfanu i podwyższonej temperatury.

Wyniki: U człowieka stwierdzono kompartmentalizację genów nadrodziny IL-1-IL-18 (środowisko wewnątrzkanalikowe i śródmięsza), ze znamioną przewagą ekspresji IL-1 β w interstycjum, a IL-1 α śródkanalikowo. IL-18 wydaje się być nisko konstytutywnie ekspresjonowane, natomiast znacznie podwyższone w nowotworach jąder. Proporcja pomiędzy IL-1 α a IL1RA, wydaje się być krytyczna dla prawidłowo funkcjonującego jądra przy wzrastającej przewadze IL-1 α w narastającym upośledzeniu spermatogenezy. U gryzoni, w prawidłowych gonadach zaobserwowano proporcję odwrotną niż u człowieka, tj. ok. 20-krotną przewagę IL-1 α nad IL-1RA. Przy całkowitym zablokowaniu spermatogenezy czynnikami zewnętrznymi proporcja ta wzrastała aż do ponad 500-krotnej przewagi IL-1 α nad IL-1RA. Przy zaburzeniach spermatogenezy na tle genetycznym, ekspresja IL-1 α obniżała się, przy względnie stabilnej ekspresji IL-1RA. W innych analizowanych genach dla cytokin, zaobserwowano statystycznie znamienne wzrost IL-6 w męskiej gonadzie ludzkiej objętej patologią (w porównaniu do kontroli), a zwłaszcza w nowotworach jąder, IL-10 wykazywała znamienne wyższą ekspresję w jądrze niż w komórkach immunokompetentnych, zaś TNFR1 znacznie wyżej w blokach spermatogenezy niż w nowotworach.

Wnioski: Oś współczynnika IL-1 α /IL-1RA wydaje się być krytycznym wskaźnikiem molekularnym dla funkcjonowania jąder u ssaków, przy czym proporcje tych genów są odwrotne u ludzi i u gryzoni. Obserwowane w ludzkiej gonadzie męskiej poziomy ekspresji IL-6, wydają się wskazywać jej pro-proliferacyjną rolę, zwłaszcza w nowotworach, poziom IL-10 w gonadzie męskiej jest znamienne wyższy niż w komórkach immunokompetentnych, zaś ekspresja receptora 1 dla TNF w jądrach jest odbiciem wysokiego poziomu apoptozy w gonadzie, a zwłaszcza w blokach dojrzewania spermatogenezy. Uzyskane wyniki dobitnie świadczą o wadze regulacji auto-/parakrynowej, mediowanej przez cytokiny, dla prawidłowego procesu spermatogenezy.

KOMÓRKI MACIERZYSTY MĘSKIEJ GONADY

STEM CELLS OF MALE GONAD

Barbara Wiszniewska, Wojciech Głabowski

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie.
Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, wojtekql@sci.pam.szczecin.pl

Komórki macierzyste dojrzałych tkanek ssaków opisywane są przez ich funkcję i charakteryzują się przynajmniej dwiema specyficznymi cechami: (i) są zdolne do „nieograniczonej” samoodnowy, wykazując niską aktywność mitotyczną przez całe życie organizmu, bez możliwości różnicowania się oraz (ii) po podziale powstają komórki potomne, podlegające różnicowaniu. Powstałe drogą podziału komórki progenitorowe wykazują duże podobieństwo funkcjonalne do komórek macierzystych, wykazują jednak wysoką aktywność proliferacyjną i zdolność do różnicowania. Wszystkie te cechy są charakterystyczne również dla macierzystych i progenitorowych komórek męskiej gonady. Pierwotne komórki germinalne wywodzą się z różnicujących się z epiblastu endodermalnych komórek ściany pęcherzyka żółtkowego i z chwilą rozwoju tkanek, komórki te zaczynają migrować – w zarodku człowieka między 5 a 8 tygodniem rozwoju – do grzebieni płciowych różnicujących się gonad. Tworzenie sznurów płciowych jest decyzyjnym momentem różnicowania się pierwotnych komórek płciowych w męską linię komórek germinalnych. Nabywanie kompetencji przez komórki germinalne rozpoczyna się już w epiblastie i indukowane jest w odpowiedzi na sygnały wysyłane przez ektodermę pozazarodkową, jak Białko Morfogenetyczne Kości 4 i 8b, białka należące do nadrodziny TGF- β oraz białka SMAD. Kluczową rolę w kompetencji i rozwoju komórek germinalnych odgrywają geny *fragilis* i *stella*. Do innych czynników regulujących nabywanie kompetencji i rozwoju komórek linii germinalnej należą: geny DAZ (*Deleted in Azoospermia*) – przy delecji genu brak komórek germinalnych; PUMILIO (PUM2) tworzący stabilny kompleks z DAZ; czynnik transkrypcyjny Oct4, podlegający silnej ekspresji w komórkach migrujących, przy czym jego brak prowadzi do apoptozy komórek. Ekspresja genów niezbędnych w procesie różnicowania komórek linii germinalnej, ujawnia się w różnych stadiach rozwoju, tak jak pojawiają się w komórkach charakterystyczne dla nich markery: niespecyficzna fosfataza kwaśna, zależny od fazy rozwoju embrionalny antygen 1, czy integryny beta 1 i alfa 6.

W gonadzie męskiej gonocyty otoczone przez komórki pierwotnych kanalików nasiennych zostają zatrzymane w fazie G0/G1 mitozy, jako prospermatogonia, zachowując potencjał proliferacyjny. Po urodzeniu, prospermatogonia migrują do błony podstawnej kanalika i różnicują się w spermatogonialne komórki macierzyste (SSC). Podobnie, jak w innych tkankach, SSC przebywają w specyficznym mikrośrodkowisku, w obrębie niszy, na którą składają się Komórka Sertoliego, elementy błony podstawnej, komórka mioidalna wspólna dla jednej SSC i komórki Sertoliego oraz przypuszczalnie komórki Leydiga. W gonadzie mężczyzny za SSC uważa się spermatogonia A_{dark} , u szczura i myszy A_s (single). Badania eksperymentalne na komórkach macierzystych u osobników dorosłych są wyjątkowo trudne z uwagi na fakt, że komórki te występują w bardzo niewielkiej liczbie, a dodatkowo bardzo słabo poznanej charakterystyki morfologicznej i biochemicznej. Badania na SSCs opierają się o identyfikację tych komórek na podstawie pewnych specyficznych cech takich jak wielkość, stopień kondensacji i obecność markerów powierzchniowych. Jak dotąd zdefiniowano szereg markerów, które mogą być przydatne do zidentyfikowania (GFR α , PLZF, Oct4), czy też wyizolowania (integryna $\alpha 6$, integryna αV , Thy-1, CD9) tych komórek. Donoszono również o udanych próbach izolacji SSC przy użyciu cytometrii przepływowej na drodze tzw. fluorescencyjnego sortowania komórek. Olbrzymie znaczenie w badaniach zdolności wyizolowanych SSC do odtworzenia linii spermatogenicznej mają przeszczepy SSC. Prowadzone badania mają na celu nie tylko wartość poznawczą, ale przede wszystkim praktyczną, jak leczenie niektórych typów niepłodności, antykoncepcja męska, autotransplantacje SSC u pacjentów po chemio- i radioterapii.

DIAGNOSTYKA ENDOKRYNOLOGICZNA HIPOGONADYZMU MĘSKIEGO

ENDOCRINOLOGICAL DIAGNOSIS OF MALE HYPOGONADISM

Marek Medraś

*Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Akademii Medycznej we Wrocławiu
50-367 Wrocław ul Pasteura 4,
marekmedras@poczta.pf.pl*

Jednym z najtrudniejszych problemów endokrynologicznej diagnostyki hipogonadyzmu męskiego jest ocena stopnia androgenizacji ustroju. Zwykle jest to utożsamiane z poziomem testosteronu. W tym aspekcie autor przedstawia kliniczne walory oznaczania testosteronu całkowitego, wolnego (oznaczanego metodą dializy równowagowej, metodą kalkulacyjną, radioimmunologiczną) oraz testosteronu biodostępnego (oznaczanego metodą z siarczanem amonu i metodą kalkulacyjną) a także innych parametrów, jak np. wskaźnika wolnych androgenów w różnych stanach przebiegających z niedomogą hormonalną jąder.

FIBRONEKTyna: AKTYWNY CZY ZBĘDNY SKŁADNIK PLAZMY NASIENIA MĘSKIEGO

FIBRONECTIN: AN ACTIVE OR USELESS COMPONENT OF HUMAN SEMINAL PLASMA

Iwona Kątnik-Prastowska

Katedra Chemii i Immunochemii Akademii Medycznej we Wrocławiu

50-345 Wrocław, ul Bujwida 44a

e-mail: iwona@immchem.am.wroc.pl

Fibronektyna (FN) jest makroglikoproteiną o elastycznej strukturze wielodomenowej, decydującej o jej funkcji w organizmie. Białko to występuje w wielu formach molekularnych, różniących się rozpuszczalnością, masą cząsteczkową, ekspresją domen i glikotopów. Obecne jest na powierzchni komórek, w macierzy zewnątrzkomórkowej i w płynach ustrojowych. FN odgrywa kluczową rolę w organizacji, regulacji metabolizmu i utrzymaniu integralności struktury wielu tkanek. Szczególnie ważną rolę pełni FN w reorganizacji tkanki podczas naprawy zranień, angiogenezy i procesach adhezji [Stupack and Chersesh, 2003].

FN jest fizjologicznym składnikiem plazmy nasienia i również obecna jest na plemnikach [Pinke et al., 1997]. W plazmie nasienia męskiego występuje wyłącznie w postaci zdegradowanej [Lilja et al., 1987; Kątnik-Prastowska et al., 2005 i 2006]. Obecność fragmentów FN w plazmie nasienia męskiego jest jak dotąd jedynym znanym przykładem, w którym obecność fragmentów fibronektyny nie jest związana z chorobą o etiologii zapalnej, ale ujawnia się w procesie fizjologicznym. Stanom zapalnym w obrębie tkanki objętej zapaleniem towarzyszy nasilona fragmentacja FN. Powstające fragmenty FN są czynnikami sprzyjającymi dalszemu rozpadowi elementów budujących macierz zewnątrzkomórkową. W warunkach zapalenia lub nasilenia procesów proteolitycznych można otrzymać „pełne” i funkcjonalne domeny fibronektyny, jakkolwiek często wykazują one zupełnie inny typ aktywności funkcjonalnej w zestawieniu z właściwościami fizykochemicznymi domen w nienaruszonej cząsteczce FN. Charakterystyczna jest również wielokierunkowość zmian wywołanych oddziaływaniem fragmentów fibronektyny [Yi and Ruoslahti, 2001].

Degradacja FN w plazmie nasienia jest znaczna. Całkowicie zniszczone są epitopy na domenach N- i C- końcowych łańcuchów polipeptydowych. W formie zdegradowanej można wykryć epitopy należące do domen komórkowej, kolagenowej i fibrynowej drugiej, oraz domeny EDA, powstającej w wyniku molekularnego składowania.

Rola FN w zaburzeniach płodności jest w świetle ówczesnych badań kontrowersyjna [Stauffer i Parsons, 1989; Wennemuth et al., 2001]. Oznaczenie całkowitego stężenia FN w plazmie nasienia nie ma większego znaczenia, chociaż jej stężenie jest proporcjonalne do ruchliwości plemników. Badania ostatnich lat wskazują na różnice jakościowe i ilościowe w stopniu degradacji FN i ekspresji epitopów, glikotopów kwasu sialowego i fukozy na FN plazmy nasienia pochodzącej od mężczyzn płodnych oraz tych żyjących w bezpotomnych związkach. W fizjologicznej plazmie nasienia wykryto ok 10 fragmentów FN o masach cząsteczkowych od 60 do 200 kDa, rozpoznawanych przez przeciwciała monoklonalne anty-domena komórkowa. Stopień degradacji FN w plazmie nasienia jest większy u mężczyzn z nieprawidłowym spermogramem i leukospermią. W większości prób nie wykryto pasm o wysokich masach cząsteczkowych, a dodatkowo pojawiają się fragmenty FN, o mniejszych masach cząsteczkowych, nieobecne w plazmie fizjologicznej. Wraz z degradacją FN dochodzi do zmian w ekspozycji epitopów i glikotopów.

Zachodzi pytanie czy obserwowane zmiany są wyłącznie rezultatem upłynięcia ejakulatu, czy też powstałe produkty degradacji są zaangażowane w proces zapłodnienia, czy analiza stopnia degradacji FN, ekspresji domen i glikotopów może być przydatna w badaniach zaburzeń płodności i czy może przyczynić się do wzbogacenia puli metod oraz kryteriów diagnostycznych używanych w diagnostyce zaburzeń płodności.

CHROMOSOMY B W GAMETOGENEZIE SSAKÓW

B CHROMOSOMES IN MAMMALIAN GAMETOGENESIS

Jarosław Sosnowski¹, Lidia Migalska¹, Agnieszka Łukaszewicz¹, Magdalena Wojnowska¹, Michał Adamski¹, Katarzyna Kowalczyk¹, Zbigniew Polański²

¹*Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań; e-mail: jarys@jay.au.poznan.pl*

²*Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,
ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków*

Nadliczbowe chromosomy B spotykane są zarówno w świecie roślin jak i zwierząt. Po raz pierwszy zostały odkryte i zidentyfikowane przez Wilsona w 1907 roku u *Hemipterae*. Charakteryzują się zróżnicowaną morfologią oraz liczbą w obrębie gatunku jak i samego osobnika. Chromosomy B nie wykazują wyraźnej homologii z autosomami i chromosomami płci. Nie dziedziczą się według praw Mendla, nie podlegają podziałowi redukcyjnemu w anafazie przez co ich segregacja zachodzi w sposób losowy, mimo tego nie prowadzi to do wzrostu liczby czy ich zaniku w kolejnych pokoleniach potomnych.

Analiza koniugacji chromosomów B w profazie mejotycznej wykazała, że w zależności od ich liczby w komórce, mogą tworzyć różne struktury, od uniwalentów, poprzez biwalenty, triwalenty, tetrawalenty do pentawalentów. Struktury te mogą też pojawiać się wspólnie, w różnych konfiguracjach. Stosunkowo często jednak tworzą uniwalenty, które u zwierząt bez chromosomów B prowadzą do apoptozy komórki. Nieparzyste struktury tworzone przez chromosomy B (uniwalenty oraz triwalenty) lokalizowały się w pobliżu biwalentu utworzonego przez chromosomy płci, co może prowadzić do reaktywacji chromosomu X i w efekcie zablokowania spermatogenezy. Co więcej lokalizowanie się chromosomów B w pobliżu chromosomów płci może wskazywać na pewne powinowactwo obu typów chromosomów a zwłaszcza chromosomu Y. Stąd można przypuszczać, że chromosomy B oraz chromosomy płci mogłyby podlegać podobnym modyfikacjom białek histonowych, w trakcie mejozy.

Jak dotąd sądzono, że chromosomy B ssaków nie zawierają genów. Prowadzone w ostatnich latach badania pozwoliły jednak zidentyfikować i zlokalizować proto-onkogen C-KIT, normalnie występujący w autosomach zestawu podstawowego, na wszystkich chromosomach B w kariotypie lisa pospolitego i obu podgatunków jenota. Obecność tego genu w chromosomach B u analizowanych gatunków psowatych rzuca nowe światło na ich pochodzenie i ewolucję oraz potencjalną rolę w genomie. Sugeruje to też, że chromosomy B powinny podlegać tym samym mechanizmom co pozostałe autosomy, a więc również zjawisku rekombinacji genetycznej, podczas mejozy.

Mimo stosunkowo licznych badań związanych z analizą struktury oraz zachowania się chromosomów B, jak dotąd nie udało się określić ich pochodzenia oraz funkcji jakie spełniają

W niniejszej prezentacji przedstawione będą wyniki badań dotyczących:

- analiz struktur koniugacyjnych tworzonych przez chromosomy B w spermatocytach lisa pospolitego oraz jenota chińskiego oraz ich wpływu na spermatogenezę;
- zjawiska rekombinacji genetycznej w obrębie chromosomów B;
- analiz modyfikacji białek histonowych w chromosomach B.

Badania finansowane ze środków na naukę w latach 2005-2008 jako projekt badawczy 2P0602929

BŁONOWA TRANSLOKACJA FOSFATYDYLOSERYNY JAKO WYKŁADNIK BIOLOGICZNYCH PROCESÓW ZACHODZĄCYCH W PLEMNIKACH LUDZKICH

PHOSPHATIDYL SERINE MEMBRANE TRANSLOCATION IN BIOLOGICAL PROCESSES OCCURRING IN HUMAN SPERMATOZOA

Małgorzata Kotwicka¹, Krystyna Filipiak¹, Magdalena Jendraszak¹,
Piotr Jędrzejczak², J.B. Warchol¹

¹Katedra i Zakład Biologii Komórki, ²Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Rokietnicka 5D, 60-806 Poznań, mkotwic@ump.edu.pl

Dotychczas nie rozstrzygnięto, czy translokacja fosfatydyloseryny w obrębie błony komórkowej plemników jest zjawiskiem związanym wyłącznie z procesem ich obumierania, czy też może mieć miejsce w różnych stanach czynnościowych komórek.

Cel badań. Celem badań było poznanie, podczas których procesów w plemnikach ludzkich następuje przemieszczenie fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej oraz jakie ma to znaczenie dla wartości biologicznej nasienia. Dla realizacji tego zamierzenia postanowiono wyjaśnić: 1) czy istnieje związek między żywotnością, ruchliwością i morfologią plemników, a translokacją fosfatydyloseryny, 2) ocenić wpływ metody swim-up na selekcję plemników z translokacją fosfatydyloseryny, 3) zbadać, czy kapacytacja, reakcja akrosomalna lub stres oksydacyjny wpływają na wystąpienie translokacji PS, 4) ocenić translokację PS w czasie śmierci nekrotycznej plemników oraz 5) określić, czy ekspozycja PS na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej plemników ma znaczenie dla procesu ich fagocytozy.

Materiał i metody badawcze. Nasienie 185 mężczyzn z normozoospermia. W badaniach oznaczano: błonową translokację fosfatydyloseryny (aneksyna-V znakowana FITC lub Cy-3), żywotność plemników (barwienie jodkiem propidionowym i odczynnikami Hoechst 33342); ruch plemników (ocena komputerowym systemem analizy ruchu); aktywne formy kaspazy-3 i 9. (metody fluorescencyjne z zastosowaniem ich inhibitorów: DEVD-FMK i LEHD-FMK); równoczesną obecność translokacji PS i aktywnej kaspazy-3 (Dual Apoptosis Assay Kit); potencjał błonowy mitochondriów (barwienie JC-1); kapacytację (metoda z tetracykliną); reakcję akrosomalną (lektyna *Arachis Hypogaeae* znakowana fluoresceiną) oraz kinetykę zmian stężenia wolnych jonów wapniowych (metoda z wykorzystaniem fluorochromu Fluo-3). Ponadto oceniano proces fagocytozy plemników w warunkach *in vitro* wykorzystując do tego celu komórki linii monocytarno-makrofagowej MONOMAC.

Wnioski. Przeprowadzone badania wykazały, że translokacja fosfatydyloseryny występuje w określonych domenach błony komórkowej plemnika, co wskazuje na ich specyficzność i istnienie lokalnych mechanizmów kontrolujących ten proces. Proces translokacji fosfatydyloseryny może wystąpić zarówno w plemnikach o prawidłowej morfologii jak i o nieprawidłowej strukturze. Translokacja fosfatydyloseryny nie jest elementem zmian zachodzących w błonie komórkowej plemników podczas procesu kapacytacji. Różnice w translokacji fosfatydyloseryny występujące w plemnikach podczas reakcji akrosomalnej wywoływanej płynem pęcherzykowym lub jonoforem A23187 są prawdopodobnie spowodowane różnym wzrostem stężenia jonów Ca^{2+} w cytozolu spowodowanym przez te czynniki. Reaktywne formy tlenu mogą powodować translokację fosfatydyloseryny jednak mechanizm tego procesu nie wiąże się w bezpośredni sposób z aktywacją kaspazy-3. Procesowi nekrozy plemników wywołanej szokiem osmotycznym towarzyszy błonowa translokacja fosfatydyloseryny. Występująca w plemnikach eksternalizacja fosfatydyloseryny może być jednym z sygnałów do fagocytozy komórek o obniżonej wartości biologicznej. Zjawisku translokacji fosfatydyloseryny towarzyszy obniżenie ruchliwości plemników, co znacząco wpływa na ich biologiczną wartość. Metoda swim-up izolacji plemników eliminowała komórki z translokacją fosfatydyloseryny, co przemawia za przydatnością tej techniki w przygotowaniu nasienia do rozrodu wspomagane.

S E S J A I I

**Tkankowo specyficzne mechanizmy regulujące fizjologiczny i
patologiczny przebieg ciąży i laktacji ssaków**

S E S S I O N I I

**Tissue specific mechanisms regulating course of pregnancy and
lactation in mammals**

KATECHOLAMINERGICZNA KONTROLA SEKRECJI PROLAKTYNY W OKRESIE LAKTACJI

CATECHOLAMINERGIC CONTROL OF PROLACTIN SECRETION DURING LACTATION

Tomasz Misztal i Konrad Górski

Zakład Endokrynologii, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN im. Jana Kielanowskiego, Jabłonna

U ludzi i zwierząt, wysoki poziom sekrecji prolaktyny w końcowym okresie ciąży i laktacji jest niezbędny do prawidłowego rozwoju gruczołu mlekowego, a następnie do utrzymania w nim produkcji mleka. Wśród innych funkcji, pełnionych przez prolaktynę w tych ważnych okresach życia, należy też wymienić stymulowanie behawioru macierzyńskiego oraz zmniejszenie wrażliwości karmiącej matki na czynniki stresowe.

Zapewnienie podwyższonej sekrecji prolaktyny z gruczołu przysadkowego w tych okresach wymaga długotrwałego przystosowania neuro-endokrynowego mechanizmu, kontrolującego uwalnianie prolaktyny. Poza okresem ciąży i laktacji, sekrecja prolaktyny kontrolowana jest przez podwzgórzowy czynnik hamujący – dopaminę (DA), na zasadzie krótkiej pętli zwrotnej. Uwolniona z przysadki do krwi prolaktyna przedostaje się poprzez spłot naczyńiówkowy do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), gdzie aktywuje system neuronów dopaminergicznych (NEDA) w podwzgórzu, za pośrednictwem swoistych receptorów. W układzie NEDA, istotną rolę w przekazywaniu sygnału prolaktyny odgrywa białko o charakterze transkrypcyjnym STAT5b, niezbędne do zainicjowania ekspresji genu hydroksylazy tyrozynowej – kluczowego enzymu w syntezie DA. W końcowym okresie ciąży i podczas laktacji, aktywacja białka STAT5b jest hamowana przez białka z rodziny SOCS, czego następstwem jest brak syntezy DA i związana z tym hiperprolaktynemia.

Wyniki badań własnych, prowadzonych na owcach oraz wyniki innych autorów, uzyskane na szczurach, wskazują, że w okresie laktacji, w podwzgórzu, syntetyzowany jest dodatkowo inny związek z grupy katecholamin, stymulujący uwalnianie prolaktyny – salsolinol. Paradoksalnie, związek ten jest syntetyzowany przez układ NEDA, a jego obecność w OUN kojarzona była dotychczas z chorobami, charakteryzującymi się dysfunkcją neuronów dopaminergicznych np. z chorobą Parkinsona. Wysokie stężenie salsolinolu stwierdzono w przestrzeniach międzykomórkowych brzuszno-przyśrodkowego podwzgórza (MBH) owcy w 4/5 tygodniu laktacji. U szczurów, obecność salsolinolu stwierdzono w wyniosłości pośrodkowej oraz w częściach gruczołowej i nerwowej przysadki mózgowej. U obydwu gatunków, impuls ssania indukuje równoległy wzrost stężenia salsolinolu i prolaktyny. Wykazano, że stymulujące działanie salsolinolu na prolaktynę w komórkach laktotropowych przysadki odbywa się za pośrednictwem cAMP.

Powyższe dane dostarczają nowe informacje na temat zmian, które dokonują się w mechanizmie kontroli sekrecji prolaktyny w końcowym okresie ciąży i na początku laktacji. Mają one na celu utrzymanie wysokiego stężenia prolaktyny, zapewniającego produkcję mleka oraz przystosowanie się karmiącej matki do nowych warunków. Salsolinol, produkowany w okresie laktacji przez układ NEDA może być postrzegany jako czynnik stymulujący uwalnianie prolaktyny – PRF.

WPLYW STEROIDÓW JAJNIKOWYCH NA STYMULOWANĄ OKSYTOCYNĄ SEKRECJĘ I SYNTEZĘ PROSTAGLANDYN W ENDOMETRIUM I MIOMETRIUM KRÓW

INFLUENCE OF OVARIAN STEROIDS ON OXYTOCIN-STYMULATED SECRETION AND SYNTHESIS OF PROSTAGLANDINS IN ENDOMETRIUM AND MYOMETRIUM IN COW

Dominika Słonina, Magdalena Kowalik, Mariola Subocz, Jan Kotwica

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,
ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: dominika@pan.olsztyn.pl*

Prostaglandyny (PGs) produkowane w macicy pełnią istotną rolę w regulacji cyklu rujowego, a także w zapoczątkowaniu i utrzymaniu ciąży oraz w porodzie. Celem doświadczeń było określenie: (1) wpływu steroidów jajnikowych: progesteronu (P4) i jego prekursora (pregnenolonu; P5) na ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę PGs: cyklooksygenazy 2 (COX2), mikrosomalnej syntazy prostaglandyny E2 typu 1 (mPGES1) i syntazy prostaglandyny F2 α typu AKR1B5 (PGFS), a także (2) wpływu P4 w obecności oksytocyny (OT) i przy jej braku na czynność sekrecyjną oraz poziom białka enzymów szlaku biosyntezy PGs: COX2, mPGES1 i PGFS w komórkach endometrium i miometrium oraz (3) lokalizacji tych enzymów w skrawkach macicy nieciężarnych krów/jalówek w 14-16 dniu cyklu rujowego.

Izolowane enzymatycznie komórki nabłonkowe endometrium oraz komórki miometrium (10^5 komórek/ml medium) hodowano w DMEM/Ham's-F12 z 10% FCS, gentamycyną przez 96 h, oraz ostatnie 24h w DMEM/Ham's-F12 z 0,1% BSA, gentamycyną. W Dośw. 1 komórki preinkubowano ze steroidami: P4 (10^{-5} M), P5 (10^{-5} M) przez 30 min., następnie inkubowano 6h z OT (10^{-7} M) oraz OT łącznie z każdym ze steroidów. Ekspresję genów w komórkach analizowano metodą Real Time PCR z użyciem specyficznych starterów dla COX2, mPGES1, PGFS i 18sRNA jako genu referencyjnego. W Dośw. 2 komórki preinkubowano 30 min. z P4 (10^{-5} M), oraz inkubowano 6h z: kwasem arachidonowym (AA - kontrola pozytywna; 10^{-5} M), OT (10^{-7} M), oraz OT łącznie z P4. Po zakończeniu inkubacji w medium oznaczono stężenie PGE2 i PGFM (metabolitu PGF2 α) metodą EIA, zaś komórki poddano analizie Western Blot. Zastosowano przeciwciała przeciwko: COX2, mPGES1 i PGFS oraz odpowiednie drugie przeciwciała skoniugowane z alkaliczną fosfatazą. W Dośw. 3 oznaczono lokalizację COX2, mPGES1 oraz PGFS w skrawkach macicy metodą immunohistochemiczną. Użyto przeciwciał przeciwko COX2, mPGES1 i PGFS, oraz innych biotynylowanych przeciwciał.

Wykazano istotnie wyższą ekspresję genu COX2 w komórkach endometrium po 6h stymulacji OT. Nie wykazano natomiast wpływu OT na ekspresję genów: PGFS i mPGES1. P4 i P5 nie wpływały na ekspresję badanych genów, natomiast podane łącznie z OT znosiły jej stymulujący wpływ na ekspresję genu COX2. Wykazano, że AA i OT zwiększają ($P<0,05$) sekrecję PGE2 i PGFM po 6h inkubacji komórek endometrium oraz miometrium. Progesteron nie wpływał ($P>0,05$) na podstawową sekrecję obu PGs, jednak podany łącznie z OT znosił jej stymulujące działanie na sekrecję PGs po 6h inkubacji obu typów komórek. Nie stwierdzono wpływu żadnego z badanych czynników na poziom białka dla enzymów szlaku biosyntezy PGs: COX2, PGFS oraz mPGES1 w badanych komórkach. Barwienia immunohistochemiczne potwierdziły obecność białek dla enzymów COX2, mPGES1 oraz PGFS w endometrium i miometrium macicy krów w 14-16 dniu cyklu rujowego.

Uzyskane wyniki wskazują, że hamujący wpływ P4 oraz innych steroidów na sekrecję PGE2 i PGF2 α z komórek endometrium i miometrium stymulowanych OT przez 6h, może być wywołany na drodze pozagenomowej. Natomiast wpływ steroidów na ekspresję genu COX2 odbywa się na poziomie transkrypcji.

Praca finansowana w ramach grantu MNiSW Nr 2P06K 038 29

WPŁYW KWASU LIZOFOSFATYDOWEGO NA SYNTEZĘ PROSTAGLANDYN W BŁONIE ŚLUZOWEJ MACICY KROWY PODCZAS CYKLU RUJOWEGO I WCZESNEJ CIĄŻY

LYSOPHOSPHATIDIC ACID INFLUENCE ON PROSTAGLANDIN SYNTHESIS IN THE BOVINE ENDOMETRIUM DURING ESTROUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY

Izabela Wocławek-Potocka¹, Edyta Brzezicka, Anna Korzekwa¹, Marta Siemieniuch¹,
Dariusz J. Skarzynski

*Zakład Immunologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polska Akademia Nauk, Olsztyn;
e-mail: wiza@pan.olsztyn.pl*

Kwas lizofosfatydowy (LPA) moduluje syntezę prostaglandyn (PG) poprzez receptor typu 3 (LPA3) w macicy myszy. Brak funkcjonalnego LPA3 w macicy myszy prowadzi do zamierania zarodków. Jednakże nasze wcześniejsze badania wykazały, że w błonie śluzowej macicy krowy brak jest ekspresji genu dla aktywnego receptora LPA3 - stwierdzono natomiast ekspresję genu dla izoformy LPA1. Wykazano, że ekspresja genu dla LPA1 była najwyższa w 17-18 dniu cyklu i ciąży w porównaniu do dnia 8-9 cyklu i ciąży oraz 2-5 dnia cyklu, przy czym w każdym z porównywanych okresów ekspresja genu dla LPA1 była wyższa w ciąży niż w cyklu. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu LPA i bydlęcego sygnału płodowego – interferonu- τ (IFN τ) na zdolności wydzielnicze komórek nabłonkowych i łącznotkankowych błony śluzowej macicy krowy w fazie lutealnej cyklu rujowego oraz we wczesnej ciąży. Określony został również wpływ LPA i IFN τ na ilościową ekspresję genów dla LPA1, oraz specyficznych syntaz prostaglandyn (PGFS i PGES) w różnych typach komórek śluzowej macicy w fazie lutealnej cyklu rujowego oraz we wczesnej ciąży u krowy.

Komórki nabłonkowe i łącznotkankowe wyizolowane enzymatycznie z macic w 8-9 dniu cyklu i ciąży, po 2 godzinnej preinkubacji, stymulowano LPA i IFN τ przez 24 godziny. W mediach inkubacyjnych mierzono stężenie PGF $_{2\alpha}$ i PGE $_2$ przy użyciu metody EIA, a w komórkach zebranych po hodowlach, określono ilościową ekspresję genów dla PGFS i PGES za pomocą metody Real Time PCR. W 8-9 dniu cyklu rujowego i ciąży LPA oraz IFN τ stymulowały syntezę i wydzielanie PGE $_2$ w komórkach tkanki łącznej błony śluzowej macicy. W 8-9 dniu ciąży LPA oraz IFN τ hamowały wydzielanie PGF $_{2\alpha}$ w komórkach nabłonka błony śluzowej macicy. W 8-9 dniu ciąży jedynie LPA spowodował wzrost ilościowej ekspresji mRNA dla LPA1 w stosunku do kontroli w komórkach łącznotkankowych błony śluzowej macicy krowy. W 8-9 dniu cyklu rujowego i ciąży wszystkie zastosowane czynniki spowodowały wzrost ilościowej ekspresji mRNA dla PGES w stosunku do kontroli w komórkach łącznotkankowych błony śluzowej macicy krowy. Dodatkowo, w 8-9 dniu ciąży LPA i IFN τ spowodowały obniżenie ilościowej ekspresji mRNA dla PGFS w stosunku do kontroli w komórkach nabłonka błony śluzowej macicy krowy.

W pracy wykazano, że LPA w regulacji funkcji wydzielniczych macicy krowy działa podobnie do zarodkowego IFN τ . W okresie pełnej dojrzałości CL, w czasie przebiegu cyklu rujowego może on stanowić dodatkowy czynnik luteotropowy. Działanie to polega na stymulacji syntezy luteotropowej PGE $_2$ poprzez stymulację ekspresji mRNA dla PGES w komórkach tkanki łącznej błony śluzowej macicy krowy. We wczesnej ciąży u krowy LPA wraz z IFN τ mogą działać ochronnie na CL ciążowe i rozwijającą się wczesną ciążę stymulując syntezę luteotropowej PGE $_2$ poprzez stymulację ekspresji mRNA dla PGES w komórkach tkanki łącznej błony śluzowej macicy krowy oraz hamując syntezę luteolitycznej PGF $_{2\alpha}$ poprzez hamowanie ekspresji mRNA dla PGFS w komórkach nabłonka błony śluzowej macicy krowy.

¹ I.W-P, AK i MS - stypendystki Programu START FNP.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSW nr 2 P06K 003 30.

AKTYWNOŚĆ SEKRECYJNA TKANEK MACICY ŚWINI – ROLA OKSYTOCYN

SECRETORY ACTIVITY OF PIGS UTERUS – THE ROLE OF OXYTOCIN

Anita Franczak, Beata Kurowicka, Genowefa Kotwica

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

Kontrola syntezy i sekrecji dwóch głównych hormonów produkowanych w macicy: luteotropowej prostaglandyny E_2 (PGE_2) i luteolitycznej prostaglandyny $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) jest ważna dla prawidłowego przebiegu cyklu rujowego oraz rozpoznania i utrzymania ciąży u świń. Większość dotychczasowych badań dokumentuje rolę błony śluzowej macicy w sekrecji obu prostaglandyn. Na modelu izolowanych, hodowanych *in vitro* skrawków i komórek mięśniówki macicy wykazaliśmy, że w tej tkance jest aktywny szlak hydrolizy fosfatydyloinozytolu i ma miejsce synteza prostaglandyn (PG). W okresie wczesnej ciąży i luteolizy u świń mięśniówka macicy produkuje więcej PGE_2 niż $PGF_{2\alpha}$. Oksytocyna, działając poprzez błonowe receptory zlokalizowane w mięśniówce i śluzówce macicy kontroluje syntezę i sekrecję PG. Hormon stymuluje sekrecję PG zależnie od statusu hormonalnego samicy, ale nie inicjuje luteolitycznych pulsów $PGF_{2\alpha}$. Sekrecja $PGF_{2\alpha}$ jest pobudzana, wówczas, kiedy poziom P_4 w osoczu krwi jest obniżony. Hormon wspomaga zatem lutealną regresję, ale jej nie rozpoczyna. W mięśniówce macicy świni OT pobudza wewnątrzkomórkowy szlak hydrolizy fosfatydyloinozytolu umożliwiając aktywację kinazy białkowej C i mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_i$). Uwalnianie $[Ca^{2+}]_i$ pod wpływem OT w komórkach mięśniówki jest skorelowane z wpływem hormonu na sekrecję PG. W obecności P_4 wpływ OT na sekrecję PG i mobilizację $[Ca^{2+}]_i$ występuje z opóźnieniem podczas luteolizy i jest zahamowany w czasie wczesnej ciąży. Oksytocyna aktywuje ekspresję enzymu szlaku cyklooksygenazy (COX-2) w błonie mięśniowej macicy, ale nie wpływa na ekspresję enzymów końcowych szlaku syntezy PG – syntazy PGE_2 (PGES) i syntazy $PGF_{2\alpha}$ (PGFS). Wykazaliśmy, że w śluzówce i mięśniówce macicy świni, oprócz produkcji PG, odbywa się również synteza i sekrecja estradiolu-17 β (E_2), który uważany jest za główny sygnał pochodzenia zarodkowego w czasie matczynego rozpoznania ciąży. Sekrecja E_2 przez endometrium w czasie ciąży jest wyższa w porównaniu z sekrecją podczas cyklu rujowego (dni 14-16). Miometrium produkuje więcej E_2 podczas luteolizy. Łączna ilość produkowanego E_2 w macicy w okresie wczesnej ciąży jest wyższa niż ilość produkowana w tym okresie przez zarodki. Substratem do syntezy E_2 w tkankach macicy jest progesteron. Oksytocyna, uznawana za główny stymulator aktywności sekrecyjnej tkanek macicy, nie wpływa na sekrecję E_2 w tym narządzie. Po raz pierwszy stwierdziliśmy, że w obu tkankach macicy ma miejsce ekspresja 17 α -hydroxylazy /C17-20 liazy cytochromu P450 - głównego enzymu warunkującego przekształcenia progesteronu i pregnenolonu w szlaku biosyntezy steroidów. Prezentowane badania dostarczają dowodów na aktywną produkcję estrogenów w tkankach macicy. Błona mięśniowa macicy świń, oprócz powszechnie znanych właściwości kurczliwych, jest również miejscem syntezy i sekrecji PGE_2 i $PGF_{2\alpha}$ podczas wczesnej ciąży i luteolizy. W tkankach macicy odbywa się proces steroidogenezy.

Praca finansowana w ramach grantu zamawianego KBN PBZ – KBN – 084/PO6/2002 oraz badań własnych nr 529-0206-0206 (UWM, Olsztyn).

EKSPRESJA CZYNNIKA WZROSTU ŚRÓDBŁONKA NACZYŃ (VEGF) I JEGO RECEPTORÓW W SZNURZE PĘPOWINOWYM ŚWINI

EXPRESSION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND ITS RECEPTORS IN THE PORCINE UMBILICAL CORD

Marcin Chruściel, Aneta Andronowska

*Zakład Histofizjologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie*

Kondycja płodu w czasie ciąży jest nierozzerwalnie związana z rozwojem naczyń krwionośnych sznura pępowinowego i łożyska. Formowanie naczyń pępkowych i łożyskowych w początkowym okresie ciąży a następnie ich wzrost skorelowany z rozmiarem płodu jest przykładem dynamicznego procesu waskulo-, angio-, i arteriogenezy. Zmianom organizacji naczyniowej w początkowym okresie towarzyszy zazwyczaj wzrost ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF), działającego poprzez receptory Flt-1 i Flk-1 (KDR). W celu potwierdzenia tej hipotezy podjęto badania dotyczące immunolokalizacji VEGF, Flt-1 i Flk-1 w strukturach sznura pępowinowego świnii oraz poziomu białka dla badanego czynnika i jego receptorów przy użyciu metody Western Blot w tkankach uzyskanych w 40, 60, 75, 90 dniu ciąży i okresie poporodowym.

Wysoką immunoreaktywność VEGF i Flt-1 bez różnic statystycznych obserwowano w śródbłonku i mięśniówce żyły i tętnic pępowinowych, nabłonku owodniowym, nabłonku przewodu omocznia oraz w pojedynczych komórkach galarety Whartona we wszystkich analizowanych dniach ciąży. Intensywność immunohistochemicznej reakcji Flk-1 była statystycznie niższa w porównaniu z VEGF i Flt-1 ($p < 0.001$) a obserwowano ją głównie w nabłonku owodni i przewodu omocznia. Najwyższy istotnie statystyczny poziom białka VEGF zaobserwowano w 40 dniu ciąży w porównaniu z dniem 75, 90 i okresem poporodowym. W przeciwieństwie do VEGF istotny statystycznie wzrost ekspresji białka Flt-1 wystąpił w 75 i 90 dniu ciąży. Nie stwierdzono, przy zastosowaniu tych samych warunków doświadczalnych ekspresji białka Flk-1.

Uzyskane wyniki wskazują na udział VEGF i jego receptorów w formowaniu i wzroście poszczególnych elementów sznura pępowinowego, a także wpływ na skład płynu owodniowego poprzez regulację przepuszczalności naczyń krwionośnych, owodni oraz nabłonka przewodu omocznia.

S E S J A I I I

Biologiczne uwarunkowania procesów spermatogenezy
Biologia i ocena nasienia cz. II

S E S S I O N I I I

Biological conditioning of spermatogenesis processes
Biology and evaluation of sperm - part II

ZASTOSOWANIE NOWYCH TESTÓW W OCENIE WARTOŚCI NASIENIA OGIERA

THE APPLICATIONS OF THE NEW TESTS FOR STALLION SEMEN EXAMINATION

Z. Podstawski, K. Kosiniak–Kamysz, A. Bittmar

*Katedra Hodowli Koni, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków,
E-mail :zpodstawski@ar.krakow.pl*

Cel pracy: Prowadzone w ostatnich latach badania nad toksycznym wpływem reaktywnych form tlenu (RFT) na żywe organizmy wzbudziły zainteresowanie systemami antyoksydacyjnymi zabezpieczającymi komórki przed negatywnym wpływem wolnych rodników tlenowych. Z uwagi na szczególną podatność plemników na generowanie RFT, systemy zabezpieczające układ rozrodczy zlokalizowane są nie tylko w mitochondriach wstawki plemnika ale także w osoczu nasienia samców. Wzrost poziomu RFT w nasieniu skutkuje nie tylko zaburzeniami ruchliwości, przeżywalności czy destabilizacji chromatyny plemników, ale także utratą ich zdolności do reakcji akrosomalnej i fuzji plemnik – oocyt. Celowym wydawało się przeanalizowanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS) w osoczu nasienia ogiera aby uzyskać odpowiedź czy pomiar TAS w osoczu nasienia ogiera mógłby być wskaźnikiem diagnostycznym w ocenie wartości nasienia

Materiał i metody: Materiałem badań było nasienie pozyskane od 164 ogierów należących do 5 ras (młp., śl., sp., wlkp., zim.) w wieku 2 – 20 lat. Każdy ejakulat bezpośrednio po pobraniu poddawano rutynowej ocenie makro i mikroskopowej określając koncentrację plemników w $1\text{ cm}^3 \times 10^9$. Z odsetka plemników o ruchu postępowym oraz całkowitej koncentracji plemników w $\text{cm}^3 \times 10^9$ pl dla każdego ejakulatu wyliczono koncentrację plemników o ruchu postępowym (rp.) w $\text{cm}^3 \times 10^9$. TAS oznaczano korzystając z zestawu odczynników firmy Randox rozcieńczając osocze nasienia 0,9 % r– r NaCl w stosunku 1:1. Zawartość TAS podano w Molach (M) M/cm^3 oraz w przeliczeniu na koncentrację plemników o ruchu postępowym $\text{M}/\text{cm}^3 \times 10^9$ rp.

Wyniki: Przeprowadzona analiza zawartości TAS $\text{M}/\text{cm}^3 \times 10^9$ rp. w nasieniu badanych ogierów wykazała, że TAS koreluje istotnie ($p < 0,01$) ujemnie z ogólną koncentracją plemników ($r = -0,41$) z koncentracją plemników o ruchu postępowym ($r = -0,52$) odsetkiem plemników ruchliwych ($r = -0,41$) oraz poruszających się ruchem postępowym ($r = -0,48$) oraz dodatnio z TAS M/cm^3 przy współczynniku korelacji $r = 0,71$

Wnioski: W oparciu o przeprowadzoną analizę wyników TAS $\text{M}/\text{cm}^3 \times 10^9$ rp. w nasieniu badanych ogierów można stwierdzić, że statystycznie istotne różnice ($p < 0,01$) w zawartości TAS w ejakulatach o zróżnicowanej ruchliwości plemników wskazują, że pomiar TAS w osoczu nasienia może być wiarygodnym wskaźnikiem diagnostycznym w stosowanej w praktyce ocenie wartości nasienia ogiera, określającym jego faktyczną wartość z 95% prawdopodobieństwem.

Badania wykonano w ramach grant badawczo -rozwojowego R 120210 (2007-2010)

METODY LUMINOMETRYCZNE W OCENIE JAKOŚCI NASIENIA

LUMINOMETRIC METHODS FOR SEMEN QUALITY EVALUATION

Piotr Gogol

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki–Państwowy Instytut Badawczy, ul. Krakowska 1
32-083 Balice/Kraków, e-mail: pgogol@izoo.krakow.pl*

Analiza aktualnego stanu wiedzy z zakresu cytobiologii oraz bioenergetyki plemników, uzyskanej stosowanymi dotychczas metodami fizjologicznymi, cytologicznymi oraz biochemicznymi wskazuje na potrzebę sięgnięcia po nowe, do tej pory jeszcze w biologii gamet męskich nie stosowane, interdyscyplinarne metody i narzędzia badawcze, na przykład z dziedziny biofizyki. Wydaje się, że duże możliwości poznawcze tkwią w zjawisku ultrasłabej luminescencji.

Wszystkie organizmy żywe są w swych procesach metabolicznych źródłem emisji fotonów (ultrasłaba luminescencja), jednakże natężenie tej emisji jest tak niskie, że do jej detekcji musi być stosowana ultraczuła aparatura pomiarowa. Do rejestracji fotonów używane są najczęściej luminometry wyposażone w fotopowielacze umieszczone w izolowanej termicznie obudowie i chłodzone w celu zmniejszenia szumów własnych. Fotopowielacz dokonuje przetworzenia rejestrowanych fotonów na impulsy elektryczne, które są następnie wzmacniane i przetwarzane na sygnał cyfrowy. Analiza skrajnie niskich natężeń emisji wymaga zastosowania związków chemicznych, takich jak luminol, lucygenina czy kompleksowo lucyferyna z lucyferazą, które pozwalają na znaczne wzmocnienie intensywności luminescencji.

Rozróżniana jest ultrasłaba luminescencja spontaniczna, charakterystyczna dla pełnej homeostazy komórki oraz ultrasłaba luminescencja indukowana, wywoływana oddziaływaniem na komórkę zewnętrznych czynników stresowych takich jak np. temperatura, światło, różne związki chemiczne i inne.

W ostatnich latach wykazano, że procesy metaboliczne przebiegające w komórce, w szczególności zaś zaburzenia tych procesów, znajdują swe odbicie zarówno w spontanicznej, jak i indukowanej ultrasłabej luminescencji. Badania indukowanej jonami żelaza luminescencji plemników wskazują na jej ścisły związek z peroksydacją lipidów i spadkiem jakości nasienia w trakcie jego konserwacji.

W referacie przedstawiono opis zjawiska luminescencji z plemników, możliwości jego detekcji i wykorzystania w ocenie jakości nasienia.

ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ DO OCENY PLEMNIKÓW LUDZKICH ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ASTENOZOOSPERMII

FLOW CYTOMETRY APPLICATION IN THE ASSESSMENT OF HUMAN SPERMATOZOA WITH A FOCUS ON ASTHENOZOOSPERMIA

Małgorzata Piasecka¹, Dariusz Gączarzewicz², Maria Laszczyńska¹, Monika Frączak³,
Maciej Kurpisz³

¹Samodzielna Pracownia Histologii i Biologii Rozwoju, Pomorska Akademia Medyczna, ul. Żołnierska 48, 71–210 Szczecin, mpiasecka@ipartner.com.pl; ²Katedra Rozrodu Zwierząt Akademia Rolnicza w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 6, 71–466 Szczecin; ³Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, ul. Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań.

Celem badań była ocena wybranych funkcjonalnych, morfologicznych i molekularnych parametrów plemników mężczyzn ($n = 110$) z prawidłową lub obniżoną ruchliwością gamet, którzy byli partnerami w niepłodnych parach. Standardowa analiza seminologiczna została przeprowadzona wg kryteriów podanych przez WHO (1999). Dodatkowo wykonano HOS-test.

Stosując analizę cytofluorymetryczną (FACSCalibur cytometer, Becton Dickinson) zbadano: 1/ żywotność plemników (test z jodkiem propidyny – PI), 2/ zmiany transbłonowego potencjału mitochondrialnego – $\Delta\Psi_m$ (test z JC-1), 3/ fragmentację jądrowego DNA – komórki TUNEL pozytywne i 4/ odsetek komórek haploidalnych z prawidłowo skondensowaną chromatyną (APO-BrdU Kit for Measuring Apoptosis by Dual color Flow Cytometry). Ponadto przeprowadzono badania w mikroskopie fluorescencyjnym i elektronowym.

Odsetki plemników żywych (komórki PI-negatywne – mediana 49,00%), z integralną błoną komórkową (komórki HOS-test pozytywne – mediana 59,00%), z mitochondriami spolaryzowanymi (organella funkcjonalne, z wysokim $\Delta\Psi_m$, gromadzące agregaty JC-1 i emitujące pomarańczową fluorescencję – mediana 61,50%) oraz odsetek komórek haploidalnych (mediana 50,97%) zmniejszał się statystycznie istotnie w nasieniu pacjentów z astenozoospermia (odpowiednio $p < 0,05$; $p \leq 0,001$) w porównaniu do pacjentów z prawidłową ruchliwością plemników (odpowiednio mediany: 56,00%; 68,00% 82,00%, 65,43%). Natomiast odsetek gamet TUNEL-pozytywnych, które w obrębie główki wykazywały zieloną fluorescencję zwiększał się istotnie w przypadku pacjentów z astenozoospermia (mediana 12,00%; $p = 0,001$) w porównaniu do pacjentów z prawidłową ruchliwością plemników (mediana 6,00%). Fragmentacja DNA plemników korelowała ujemnie statystycznie istotnie z koncentracją ($r_s = -0,28$; $p = 0,007$), ruchem postępowym ($r_s = -0,38$; $p < 0,001$), integralnością błony komórkowej ($r_s = -0,38$; $p = 0,001$) i z żywotnością ($r_s = -0,38$; $p = 0,030$) plemników, a także z odsetkiem komórek haploidalnych w nasieniu ($r_s = -0,51$; $p < 0,001$). Natomiast funkcja mitochondriów korelowała dodatnio istotnie statystycznie z koncentracją ($r_s = 0,36$; $p = 0,008$), morfologią ($r_s = 0,47$; $p < 0,001$), ruchem postępowym ($r_s = 0,51$; $p < 0,001$) oraz z żywotnością ($r_s = 0,27$; $p = 0,049$) plemników. Odsetek komórek haploidalnych korelował dodatnio z koncentracją ($r_s = 0,52$; $p < 0,001$), morfologią ($r_s = 0,29$; $p = 0,006$), ruchem postępowym ($r_s = 0,51$; $p < 0,001$) i z integralnością błony komórkowej ($r_s = 0,50$; $p < 0,001$) plemników. Badania ultrastrukturalne wykazały w nasieniu mężczyzn z obniżoną ruchliwością gamet liczne zaburzenia kondensacji chromatyny, defekty wstawki i witki plemników świadczące o niedojrzałości tych komórek oraz różnorodne konglomeraty plemników, często zawierające ich fragmenty.

Uzyskane wyniki wskazują, że w astenozoospermii dochodzi do funkcjonalnych, morfologicznych i molekularnych defektów plemników wynikających najprawdopodobniej z zaburzeń morfogenezy tych komórek a wyrażających się częściową eliminacją plemników, zmniejszeniem liczby komórek haploidalnych, obniżeniem integralności błony komórkowej plemników i ich chromatyny oraz uszkodzeniem ich mitochondriów.

KOMPUTEROWA I CYTOMETRYCZNA ANALIZA ZMIAN WYBRANYCH WŁAŚCIWOŚCI PLEMNİKÓW KNURA W NASIENIU PODDANYM KONSERWACJI W STANIE PŁYNNYM*)

COMPUTER ASSISTED AND CYTOMETRIC ANALYSIS OF CHANGES OF CHOSEN SPERMATOZOAL CHARACTERISTICS IN EXTENDED CHILLED BOAR SEMEN

Wojciech Nizański¹, Agnieszka Partyka², Anna Rząsa³, Iwona Zbyryt⁴,
Andrzej Dubiel¹, Ewa Łukaszewicz²

¹Katedra i Klinika Rozrodu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław, wojtek.nizanski@interia.pl, ²Zakład Hodowli Drobiu, Wydział Biologii i Hodowli, ³Zakład Prewencji i Immunologii Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, ⁴Katedra Epizootologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Celem niniejszych badań była ocena zmian właściwości plemników knura w nasieniu rozrzedzonym i inkubowanym przez 240. godzin w temperaturze +18°C przy pomocy barwienia fluorescencyjnego, cytometrii przepływowej oraz komputerowo wspomaganego analizatora jakości nasienia.

Eksperyment przeprowadzono na 35. ejakulatach pobranych od 7. knurów. Tuż po pobraniu filtrowano je i rozrzedzano za pomocą rozrzedzalnika Safe Cell+ (IMV Technologies, France) do końcowej koncentracji plemników 30 x10⁶/ml. Jakość nasienia poddawano kontroli w godzinach: 0, 24, 48, 96, 168 i 240. Do oceny odsetka plemników żywych i martwych zastosowano barwienie fluorescencyjne SYBR-14/PI (Live/Dead Viability Kit, Molecular Probes, USA). Status DNA określano wykorzystując metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny (AO) za pomocą uproszczonego testu oceny struktury chromatyny plemnika (Sperm Chromatin Structure Assay-SCSA). Oceniano wskaźnik fragmentacji DNA (Defragmentation Index - DFI) i populację plemników o wysokim powinowactwie do AO (High DNA Stability – HDS). Ciągłość akrosomów oceniano przy pomocy lektyny *Arachis hypogaea* (PNA) związanej z fluoresceiną barwiącą jedynie akrosomy uległe reakcji akrosomalnej lub akrosomy uszkodzone. Aktywność mitochondriów plemnikowych była określana za zastosowaniem rodaminu 123 (Rhodamine 123). Próbkę poddano analizie w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Badaniom poddano również właściwości ruchowe plemników przy zastosowaniu komputerowego analizatora IVOS 12.2l (Hamilton Thorne, USA).

Odsetek plemników żywych (SYBR-14) nie ulegał istotnym zmianom przez 168 godzin inkubacji. Istotny (P<0,001) wzrost odsetka plemników martwych (PI) odnotowano w 96. godzinie inkubacji. Istotny (P<0,001) spadek odsetka plemników z niezmiennym akrosomem obserwowano w 168. godzinie po rozrzedzeniu nasienia. Od 48. godziny inkubacji nasienia dochodziło do istotnego wzrostu współczynnika DFI (P<0,001). Podczas całego okresu przechowywania nasienia nie stwierdzono istotnych zmian odsetka plemników o wysokim powinowactwie do oranżu akrydyny (HDS). Odsetek plemników z zachowanym potencjałem błonowym w obrębie mitochondriów zmniejszał się istotnie (P<0,001) w 240. godzinie po rozrzedzeniu nasienia. Parametry jakościowe ruchu plemników opisujące ich szybkość (VAP, VSL, VCL) nie ulegały zmianie przez pierwszą dobę inkubacji nasienia. Podczas drugiej doby zaczęło dochodzić do zmian wskazujących na zmniejszenie szybkości ruchu męskich gamet. Parametry ALH i BCF ulegały bardzo niewielkim zmianom przez cały okres inkubacji. Nie zanotowano podczas inkubacji nasienia ruchowej hiperaktywacji plemników. Podczas całego okresu przechowywania nasienia zaobserwowano postępujący spadek odsetka plemników wykazujących aktywność ruchową (MOT), zmniejszanie liczebności subpopulacji plemników o ruchu szybkim (RAPID).

Wyniki doświadczenia wskazują, że w rozrzedzonym nasieniu knura przechowywanym w temperaturze +18°C już po dwóch dobach dochodzi do osłabienia struktury DNA chromatyny plemnikowej. Żywotność plemników (SYBR-14) i status funkcjonalny mitochondriów są relatywnie niezmiennie podczas 168 godzin inkubacji rozrzedzonego nasienia.

Do istotnego przerwania ciągłości struktury akrosomów dochodzi począwszy od 7. doby inkubacji. Podczas pierwszej doby przechowywania nasienia nie dochodzi do zmian właściwości jakościowych opisujących ruch plemników. Równocześnie jednak już od pierwszych godzin po rozrzedzeniu nasienia zaczyna dochodzić do zauważalnych zmian proporcji pomiędzy populacjami opisującymi ilościowo właściwości ruchowe plemników. Zdecydowany spadek odsetka plemników o ruchu szybkim (RAPID) rzutować może negatywnie na zdolności męskich gamet do penetracji kolejnych barier w obrębie narządu płciowego samicy.

*Badania wykonano w ramach projektu badawczego finansowanego przez MNiSW N308 008 31/3067

IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA TRANSFERYNY PLAZMY NASIENIA KARPIA

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TRANSFERRIN OF COMMON CARP SEMINAL PLASMA

Mariola Wojtczak¹, Dominik Żmijewski¹, Patrycja Jurecka², Ilgiz Irnazarow², Mariola Słowińska¹, Andrzej Ciereszko¹

¹ Zakład Biologii Nasienia, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn, e-mail: mario@pan.olsztyn.pl

² Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej PAN, ul. Kalinowa 2, 43-520 Gołysz,

Transferyna (Tf) jest białkiem wielofunkcyjnym, oprócz udziału w transporcie jonów żelaza charakteryzuje się właściwościami antybakteryjnymi i antyoksydacyjnymi. W układzie rozrodczym ssaków odgrywa ważną rolę w steroidogenezie oraz spermatogenezie, uczestnicząc m.in. w transporcie żelaza do rozwijających się komórek rozrodczych. Nasze badania wykazały obecność wysokich stężeń Tf w plazmie nasienia karpia oraz związek pomiędzy polimorfizmem Tf a parametrami ruchu plemników karpia. Dalsze badania funkcji Tf w nasieniu ryb wymagają izolacji dużych ilości Tf oraz jej pogłębionej charakterystyki.

Celem pracy było: 1) opracowanie wydajnej metody izolacji i oczyszczania transferyny z plazmy nasienia karpia, 2) określenie właściwości fizykochemicznych Tf oraz 3) otrzymanie przeciwciał skierowanych przeciwko Tf i ich wykorzystanie do badań porównawczych.

Nasienie pozyskano od karpia utrzymywanych w Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej PAN w Gołysz. Do izolacji i charakterystyki Tf wykorzystano nasienie pozyskane od osobników charakteryzujących się obecnością pojedynczej formy Tf (DD). Izolację Tf przeprowadzono stosując chromatografię powinowactwa (ConA-Sepharose), oddziaływań hydrofobowych (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow) oraz filtrację żelową (SuperdexTM 200) w systemie FPLC. Izoelektroogniskowanie przeprowadzono w żelach poliakrylamidowych IEF (pH 5-8). Masę cząsteczkową określono przy użyciu spektrometrii mas. Glikoproteinowy charakter Tf sprawdzano elektroforetycznie stosując specyficzne barwienie przy użyciu Pro-Q Emerald 300 Glycoprotein Gel Stain Kit. Poliklonalne przeciwciała anti-Tf plazmy nasienia karpia otrzymano poprzez dwukrotną śródskórną immunizację królików oczyszczonym preparatem Tf (200 µg). Przeciwciała oczyszczano chromatograficznie na złożu Protein A-HP. Oczyszczone przeciwciała wykorzystano do badania reakcji z plazmami nasienia jазia, leszcza, karasia, bolenia, pstrąga tęczowego, okonia oraz krwi karpia (metoda western-blot).

Opracowano wydajną trzy etapową procedurę oczyszczania Tf, obejmującą chromatografię powinowactwa, oddziaływań hydrofobowych oraz filtrację żelową. W wyniku zastosowania tej procedury uzyskano około 1 mg preparatu czystej Tf wychodząc z 30 mg białek plazmy nasienia (11 ml plazmy nasienia). Masę cząsteczkową Tf wyznaczono na 73,6 kDa, punkt izoelektryczny na 5,24. Wykazano, że w przeciwieństwie do większości Tf zwierząt, Tf plazmy nasienia karpia charakteryzuje się brakiem komponenty węglowodanowej. Uzyskane przeciwciała poliklonalne, umożliwiły potwierdzenie homogenności oczyszczonego preparatu Tf oraz okazały się przydatne do badań porównawczych. Wykazano wysokie podobieństwo immunologiczne Tf plazmy nasienia karpia do Tf krwi karpia oraz Tf plazmy nasienia ryb karpiowatych, zaś niskie do Tf plazmy nasienia innych gatunków ryb.

Reasumując, opracowana metoda izolacji pozwala na uzyskanie dużych ilości homogennych preparatów Tf. Cechą charakterystyczną Tf plazmy nasienia karpia jest brak komponenty węglowodanowej. Dzięki uzyskaniu przeciwciał anti-Tf stwierdzono obecność Tf w plazmie nasienia innych gatunków ryb z rodziny karpiowatych a także wykazano homologię Tf plazmy nasienia z Tf zlokalizowaną w surowicy krwi karpia.

Praca wykonana w ramach grantu N N311 098934

WPLYW POZYCJI SOCJALNEJ NA LICZBĘ I JAKOŚĆ GAMET MĘSKICH SAMCÓW NORNICY RUDEJ

INFLUENCE OF SOCIAL DOMINANCE ON SPERM QUANTITY AND QUALITY IN BANK VOLE MALES

Małgorzata Kruczek, Agnieszka Pasternak, Katarzyna Sowa-Lewandowska

Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
e-mail: malgorzata.kruczek@uj.edu.pl

Nornica ruda, *Myodes glareolus*, jest gatunkiem prezentującym polygyniczny system socjalny; to samice aktywnie wybierają partnera seksualnego. Na podstawie produkowanych przez samce substancji zapachowych samice rozpoznają osobniki aktywne hormonalnie, co więcej, mając do wyboru samca dominanta, o wyższym poziomie krążącego we krwi testosteronu, i subordynanta wybierają tego pierwszego na partnera seksualnego. Dlaczego?, w czym samiec o wysokiej pozycji socjalnej jest „lepszy” od subordynanta?

Celem prezentowanej pracy było sprawdzenie czy pozycja socjalna samców ma wpływ na liczbę i jakość produkowanych przez nie komórek rozrodczych.

Badania przeprowadzono na zwierzętach pochodzących z hodowli laboratoryjnej. Pozycję socjalną samców określano na podstawie zachowań agresywnych w 10-minutowym teście konfrontacji przeprowadzanym przez 7 kolejnych dni. Samce dominanci i subordynanci zabijano, odślaniano układ rozrodczy, wycinano około 2 cm odcinek obu nasieniowodów a ich zawartość wyciskano do 100 μ l pożywki M2 (Sigma). Z tak przygotowanej mieszaniny pobierano materiał do oceny ilościowej i jakościowej nasienia. Liczbę gamet męskich w 1 ml³ nasienia oceniano, po odpowiednim rozcieńczeniu, w komorze Bürkera. Za wskaźnik jakości nasienia przyjęto następujące parametry: zdolność do ruchu, budowę błony cytoplazmatycznej witki, żywotność, stopień dojrzałości plemników. Określano procentową zawartość gamet prawidłowych; każdy pomiar wykonywany był dwukrotnie i obliczano średnią arytmetyczną. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Ilość i jakość męskich komórek rozrodczych samców nornicy rudej o odmiennym statusie socjalnym. Wartości średnie $\pm$ SEM.

Samiec	Plemniki				
	liczba w 1 ml ³	dojrzałe	żywe	witka prawidłowa	ruchliwe
dominant	122,7 $\pm$ 9,57	0,90 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01
subordynant	66,6 $\pm$ 3,26	0,78 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,02
P	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Zarówno liczba, jak i wszystkie parametry opisujące jakość gamet męskich były statystycznie wyższe dla samców o wysokiej pozycji socjalnej w porównaniu z subordynantami.

Samice nornicy rudej wybierając na partnera seksualnego samca dominanta czerpią ewidentne korzyści z takiego wyboru. Otrzymują bowiem więcej i to jakościowo lepszych plemników, co może zwiększyć ich sukces reprodukcyjny, zwłaszcza, że u tego gatunku dochodzi do wielokrotnych kopulacji a „lepsze” gamety mają większe szanse na zwycięstwo w konkurencji z gorszymi gametami pochodzącymi od subordynantów.

S E S J A I V

Centralne mechanizmy regulacyjne procesów rozrodu

S E S S I O N I V

Central regulatory mechanisms of reproductive processes

RÓŻNICOWANIE PŁCIOWE MÓZGU

SEXUAL DIFFERENTIATION OF THE BRAIN

Lidia Wenda - Różewicka

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Pomorska Akademia Medyczna, ul. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin, lidroz@sci.pam.szczecin.pl*

Kobiety i mężczyźni mimo, że przynależą do tego samego gatunku *Homo sapiens*, zdecydowanie różnią się od siebie. Różnice te dotyczą nie tylko budowy anatomicznej, ale przede wszystkim struktury morfologicznej i czynnościowej mózgu, najistotniejszego narządu dla ludzkich działań i emocji. Odmienność zachowań i spostrzeżeń, inna psychika i reakcje, inna wydajność tkanek i narządów, wreszcie inne zachowania i preferencje seksualne – to główne cechy różniące kobietę i mężczyznę. O tym czy nasza budowa anatomiczna – męska lub żeńska będzie korelowała z właściwym dla danej płci zróżnicowaniem płciowym mózgu, decyduje wczesny okres rozwoju płodowego. To właśnie we wczesnym okresie embriogenezy powstają nie tylko męskie i żeńskie narządy płciowe, ale ustalają się również męskie i żeńskie cechy mózgu, a ściślej – typowe dla mężczyzn i kobiet ośrodki zachowania seksualnego i preferencji seksualnej.

Mimo, że płeć zostaje zdeterminowana w momencie poczęcia, do 7-go tygodnia życia płodowego gonada jest niezróżnicowana. Istnieje w tym czasie również podwójne wyposażenie narządów płciowych dodatkowych: przewody prączone, z których u mężczyzn rozwiną się najądrza, nasieniowody i pęcherzyki nasienne i przewody przyprączone, z których u kobiet powstaną jajowody, macica i górna część pochwy.

Jeżeli w wyposażeniu genetycznym zarodka znajduje się chromosom Y, to w 7 tyg. życia płodowego z niezróżnicowanej gonady powstaje jądro. Rozwój męskiego układu płciowego indukowany jest hormonami syntetyzowanymi przez płodową gonadę. Najwcześniej produkowany jest peptyd powodujący zanik przewodów przyprączonych – hormon antymüllerowski (AMH) i testosteron (T) stymulujący rozwój wewnętrznych narządów płciowych. W nieco późniejszym okresie T staje się prohormonem dla DHT, indukującego rozwój zatoki moczowo-płciowej i zewnętrznych narządów płciowych. Hormony te powstają lokalnie i rozprzestrzeniają się dyfuzyjnie w miejscu, gdzie powstają narządy płciowe. Kiedy w zarodku wytworzą się naczynia krwionośne, T transportowany jest do mózgu, wchodzi do neuronów, aromatyzowany jest do estradiolu (E), który to hormon różnicuje mózg wg męskiego wzorca.

Pierwotny model mózgu jest zawsze żeński. Jeżeli w wyposażeniu genetycznym zarodka znajduje się chromosom X, męskie hormony płciowe nie pojawiają się i w 13 tyg. życia płodowego niezróżnicowana gonada rozwija się w jajnik, a pierwotny model mózgu pozostaje nie zmieniony. W rozwoju żeńskiego układu płciowego biorą udział estrogeny - w małej ilości te produkowane przez płodową gonadę, w większej te pochodzenia matczynego i łożyskowego.

Zatem pierwotną tendencją niezróżnicowanej gonady jest zawsze utworzenie płci żeńskiej. Tak wczesny rozwój jądra - 6 tygodni przed powstaniem jajnika, nie jest zjawiskiem samym w sobie. Jądro powstaje tak wcześnie dlatego, bo ma do spełnienia określoną misję. Ma wyprodukować hormony, które zniszczą zawiązki wewnętrznych narządów płciowych żeńskich, zainicjują rozwój narządów płciowych męskich i ukształtują mózg wg męskiego wzorca. W tym współdziałaniu gonad i mózgu zdarzają się błędy. Męska płodowa gonada może wytworzyć dostateczną ilość hormonów do zapoczątkowania i rozwoju narządów płciowych, ale nie będzie w stanie wytworzyć dodatkowo tyle hormonów by ukształtować mózg wg męskiego wzorca. Dziecko urodzi się z kobiecym mózgiem w męskim ciele. Podobnie płód genetycznie żeński może zostać przypadkowo poddany działaniu hormonu męskiego, podawanego jako lek kobietom w ciąży. Efektem będą narodziny dziewczynki z męskim mózgiem.

Przeprowadzono wiele badań doświadczalnych, które potwierdziły, że hormony steroidowe podane we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego wywołują trwałe, nieodwracalne zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i powodują zmianę zachowań i preferencji seksualnych. Z kolei gdy minie krytyczny okres rozwoju i mózg zostaje już uformowany na wzór męski lub żeński, nie ulega wpływom hormonów płci przeciwnej.

Steroidy wykazują wielokierunkowe działanie w OUN. Receptory dla E i T obecne są w wielu strukturach mózgu. E zwiększa liczbę wyrostków na dendrytach niektórych neuronów, co w efekcie umożliwia wytworzenie większej liczby połączeń synaptycznych. Wpływa bezpośrednio na syntezę i uwalnianie neurotransmiterów i na postsynaptyczne receptory oraz pośrednio na transkrypcję genów. Istnieją udowodnione dane, że również neuroprzekaźniki biorą udział w różnicowaniu płciowym mózgu. Niektóre leki wpływające na neurotransmisję podane w krytycznym dla różnicowania płciowego okresie płodowym, mogą znosić lub nasilać defeminizujące działanie T, zmieniając wzory zachowań i preferencji seksualnych.

Klasyczna teoria oddziaływania steroidów na OUN obejmuje efekty organizacyjne i aktywacyjne. Pierwsze mają miejsce w opisanym już, wczesnym okresie życia płodowego, kiedy hormony działają na rozwijający się mózg i nadają mu męski lub żeński charakter. Drugie to interakcje steroidów z dojrzałymi neuronami i wywoływanie krótkotrwałych reakcji endokrynnych lub behawioralnych, innych dla samców i samic.

Dymorfizm płciowy OUN dotyczy zarówno różnic w budowie morfologicznej mózgu, jak i zróżnicowania mechanizmów czynnościowych kontrolujących funkcje płciowe. Różnice morfologiczne występują w wielu strukturach mózgu – jądrze migdałowatym, hipokampie, prążkowiu, w budowie ciała modelowanego, a także w korze mózgu, tyłomózgowiu i śródmózgowiu. Jednak największy dymorfizm płciowy skupiony jest wokół trzeciej komory mózgu, w polu przedwzrostowym przedniego podwzgórza. Występują tu różnice w długości włókien łączących neurony, odmienny schemat odgałęzień, odmienne drogi którymi hormony docierają do różnych miejsc przeznaczenia w mózgu. Większość informacji w tym temacie pochodzi z badań doświadczalnych wykonanych u gryzoni. Neuronalna kontrola ludzkich zachowań płciowych jest bardziej złożona, wobec nadrzędnej roli kory mózgu nad podwzgórzem. Występują tu różnice w wielkości niektórych jąder podwzgórza i to zarówno między mężczyzną i kobietą, jak również między mężczyznami homo- i heteroseksualnymi. Ta ostatnia jest jedną z nielicznych, ale potwierdzonych zmian w mózgu mężczyzn homoseksualnych.

Mimo że hormony steroidowe i neuroprzekaźniki mają niepodważalny wpływ na różnicowanie płciowe mózgu, nie można w tym procesie pominąć, zapisanych genetycznie, określonych cech neuronów tworzących nerwowe ośrodki płciowe czy obecności jąderowych receptorów dla T i E. Różnicowanie płciowe mózgu jest bowiem procesem złożonym, wymagającym prawidłowej ekspresji wielu białek, odpowiedniego stężenia hormonów i pojawienia się ich w ściśle określonym czasie rozwoju płodowego.

POSTNATALNE MECHANIZMY NEUROENDOKRYNOWE PROWADZĄCE DO ROZPOCZĘCIA PROCESU DOJRZEWANIA PŁCIOWEGO U SSAKA

THE POSTNATAL NEUROENDOCRINE MECHANISMS LEADING TO THE INAUGURATION OF PUBERTY IN THE MAMMAL

Marta Wańkowska

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Instytucja 3, 05-110 Jabłonna,
e-mail: m.wankowska@ifzz.pan.pl*

U ssaków procesy rozrodcze są kontrolowane przez dwa układy regulacyjne, nerwowy i wydzielania wewnętrzne. Subtelne oddziaływanie między nimi jest niezbędne do wywołania i realizacji kaskady mechanizmów procesu dojrzewania somatycznego, tzn. postnatalnego wzrostu i rozwoju, prowadzącego do osiągnięcia dojrzałości płciowej na drodze adaptacji organizmu do warunków środowiska zewnętrznego. Mechanizmy te są uwarunkowane koordynacją sekrecji hormonu: wzrostu (GH), luteinizującego (LH) i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (FSH). Głównymi ośrodkowymi czynnikami kontrolującymi czynności somatotropowe są hormon uwalniający GH i somatostatyna. Gonadoliberyna (GnRH) natomiast koordynuje endokrynowe mechanizmy gonadotropowe. Aktywność neuronów GnRH zmienia się w zależności od warunków środowiska neuroendokrynowego i neurotransmisyjnego ośrodkowego układu nerwowego, które jest wypadkową działania bodźców środowiska zewnętrznego (np. fotoperiodu) i wewnętrznego (np. steroidów gonadowych, stanu odżywienia organizmu). Rozpoczęcie okresu dojrzewania płciowego polega na zmianie neonatalno-infantylnego typu sekrecji w układzie GnRH/hormony gonadotropowe, na „dorosły” typ sekrecji. Pierwszy charakteryzuje się niską aktywnością gonadoliberynowego kontinuum neuronowego w polu przedwzrostowym i podwzgórzu oraz komórek gonadotropowych w gruczole przysadki mózgowej w warunkach silnego oddziaływania ujemnego sprzężenia zwrotnego steroidów gonadowych. „Dorosły” typ sekrecji natomiast charakteryzuje się fazową i synchroniczną aktywacją neuronów GnRH, powodującą wzrost amplitudy i częstotliwości pulsów GnRH i LH w warunkach dodatniego sprzężenia zwrotnego steroidów gonadowych. Ważnym etapem w rozwoju postnatalnym każdego ssaka jest okres odchowu przy matce, zwany infantylnym. Przebieg neuroendokrynowych procesów tego okresu jest pod wpływem czynników środowiska zewnętrznego, związanych z normą psychobiologiczną odchowu przy matce. Jest to kluczowy etap ontogenezy polegający na intensywnym wzroście i wprowadzeniu ssaka w okres juvenilny, inaugurujący dojrzewanie płciowe. U naczelnych i człowieka, kulminacyjnemu przyspieszeniu procesów somatotropowych towarzyszy proces dojrzewania mechanizmów gonadotropowych podczas pokwitania, tzn. końcowego etapu okresu juvenilnego. U innych ssaków, neuroendokrynowe mechanizmy, decydujące o egzystencji organizmu w środowisku zewnętrznym, ingerują w mniejszym lub większym stopniu w synchronizację równoczesnego przebiegu procesów płciowych i wzrostowych dojrzewania somatycznego, na drodze adaptacji gruczołu przysadki mózgowej do warunków otoczenia. W przeciwieństwie do naczelnych, u szczurów wysokie stężenia GH, które są podobne do stężeń obserwowanych u organizmów dorosłych, podczas procesu dojrzewania płciowego nie korelują z przyspieszonym wzrostem. Podobnie do samicy owcy, przyspieszony wzrost jest obserwowany podczas okresu infantylnego i infantylny/juvenilny okres przejściowy u samicy szczura. U owcy intensywna sekrecja GH podczas odchowu jest istotna dla przejścia od okresu infantylnego do juvenilnego ontogenezy, zdefiniowanego jako dojrzewanie mechanizmów wzrostowych. Okres juvenilny natomiast następuje po oddzieleniu od matki, prowadzi do rozpoczęcia u samców procesu dojrzewania płciowego po 15. tygodniu życia, w odróżnieniu od samic, u których ten proces rozpoczyna się 15 tygodni później. U samicy owcy do rozpoczęcia procesu dojrzewania płciowego niezbędna jest synchronizacja w czasie dwóch parametrów neuroendokrynowej regulacji rozwoju płciowego. Są to endogenne czynniki dojrzałości subpopulacji gonadotropów w gruczole przysadki mózgowej oraz środowiskowy czynnik długości dnia sezonu optymalnego dla czynności rozrodczych. Neuroendokrynowe mechanizmy integrujące procesy dojrzewania somatycznego są więc u samicy owcy natury sezonowej, działają na poziomie gruczołu przysadki mózgowej, polegają na wyhamowywaniu procesów wzrostowych i prowadzą do zakończenia dojrzewania wzrostowego i rozpoczęcia dojrzewania płciowego dopiero w sprzyjających warunkach środowiska zewnętrznego.

ROLA UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO W REGULACJI PROCESÓW ROZRODU NA POZIOMIE OUN W WARUNKACH STRESU IMMUNOLOGICZNEGO

IMMUNOREGULATION OF REPRODUCTIVE PROCESSES ON CENTRAL LEVEL IN STRESS CONDITIONS

Dorota Tomaszewska-Zaremba, Andrzej Herman

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego, PAN, 05-110 Jabłonna, d.tomaszewska@ifzz.pan.pl

Zaburzenia procesów rozrodczych są istotnym schorzeniem cywilizacyjnym stwarzającym poważne problemy badawcze i lecznicze tak w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie interakcją pomiędzy układami regulującymi procesy rozrodu i procesy odpornościowe. Te dwa systemy rozwinęły skomplikowaną sieć dwukierunkowej komunikacji poprzez wspólne ligandy i receptory w celu optymalnej regulacji procesów rozrodu.

Stres immunologiczny, jakim są infekcje bakteryjne i wirusowe jak również wiele innych chorób, wpływa na układ rozrodczy samicy w różny sposób, począwszy od zaburzeń w sekrecji hormonów osi podwzgórze – przysadka - gonady, prowadząc do całkowitej bezpłodności. Podwzgórze zdaje się być strukturą pełniącą kluczową rolę w hamującym działaniu stresu immunologicznego na sekrecję gonadoliberyny (GnRH), gonadotropiny i zahamowaniu funkcji rozrodczych. Działanie to zachodzi poprzez zmianę syntezy i uwalniania GnRH w podwzgórze, jak również na poziomie przysadki poprzez hamowanie uwalniania LH z komórek gonadotropowych przysadki w odpowiedzi na GnRH. Dane literaturowe jak i badania własne wskazują na istotną rolę prozapalnych cytokin (IL-1, IL-6 i TNF- α) jako głównych mediatorów antyreprodukcyjnego działania stresu immunologicznego. Z badań przeprowadzonych na owcy wynika, iż główną rolę w hamowaniu sekrecji GnRH i integracji pomiędzy działaniem układu odpornościowego i rozrodczego na poziomie podwzgórza odgrywa IL-1 β . Działanie tej cytokiny może włączać różne mechanizmy neuralne: bezpośredni wpływ poprzez receptory IL-1 β na neuronach GnRH (prowadząc do zmian na poziomie transkrypcji i translacji), jak również działanie pośrednie poprzez inne neuromediatory takie jak: opioidy, katecholaminy, GABA prostaglandyny czy NO.

PROFIL SEKRECJI HORMONÓW GONADOTROPOWYCH U OWIEC O ZABURZONYM RYTMIE SEZONOWOŚCI

PROFILE OF GONADOTROPIC HORMONES SECRETION IN SHEEP WITH DISTURBED RHYTHM OF SEASONALITY

¹Edyta Molik, ²Tomasz Misztal, ²Katarzyna Romanowicz, ¹Dorota Zięba, ¹Edward Wierchoś

¹Katedra Hodowli Owiec i Kóz, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,

²Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego PAN w Jabłonie k/Warszawy

Następujące po sobie procesy fizjologiczne u zwierząt są często zsynchronizowane ze zmianami warunków w środowisku zewnętrznym, a także uwarunkowane działaniem zegara biologicznego. Wiele gatunków ssaków charakteryzuje się sezonowością rozrodu. U owiec, zjawisko sezonowości odnosi się nie tylko do aktywności rozrodczej, lecz dotyczy także laktacji - parametry mleczności w okresie użytkowania mlecznego są ściśle związane z długością dnia. Badając wpływ sztucznych warunków dnia krótkiego (16D:8L) oraz melatoniny na parametry mleczności owiec w okresie wiosenno-letnim, określono czy użytkowanie mleczne owiec nie zaburza indukowanego w takich warunkach wzrostu sekrecji hormonów gonadotropowych - LH i FSH.

Badania przeprowadzono na 60 sztukach polskich owiec długowiełnych, wykończonych w naturalnym dla nich okresie zimowym (luty). Owce po odchowaniu jagniąt (56 dni), podzielono na 3 grupy i przeznaczono do użytkowania mlecznego (maj – wrzesień). Matki z grupy 1 (G1 - kontrola) utrzymywano w warunkach naturalnej długości dnia; owce z grupy 2 (G2) utrzymywano w warunkach 16D:8L; natomiast matkom grupy 3 (G3) podano podskórnie implanty melatoniny (Ceva Animal, France). W okresie użytkowania mlecznego, co 4 tygodnie, wykonywano 6-godzinną kolekcję krwi (co 30 min.) od 6 owiec z każdej grupy. W osoczu oznaczono stężenie LH i FSH metodą RIA.

Średnie stężenie LH w grupie G1 rosło stopniowo od maja ($5,32 \pm 0,2$ ng/ml), osiągając najwyższą wartość w sierpniu ($6,70 \pm 0,2$ ng/ml, $P < 0,01$). W grupie G2, w porównaniu do grupy G1, istotny ($P < 0,01$) wzrost stężenia LH nastąpił już po 4 tygodniach od wprowadzenia warunków 16D:8L (maj, $6,26 \pm 0,2$ ng/ml). Stężenie LH w grupie G2 utrzymywało się następnie na podobnym poziomie do końca doświadczenia. W grupie G3, średnie stężenie LH kształtowało się na poziomie wyższym niż w grupie G1. Maksymalne stężenie LH w grupie G3 odnotowano w sierpniu ($7,3 \pm 0,2$ ng/ml) i było ono istotnie ($P < 0,01$) wyższe od stężenia LH w grupie G1 i G2.

Średnie stężenie FSH w grupie G1 rosło stopniowo od maja ($6,59 \pm 0,2$ ng/ml), osiągając najwyższą wartość w sierpniu ($10,5 \pm 2,6$ ng/ml, $P < 0,05$). W grupie G2, w porównaniu do grupy G1, istotny ($P < 0,01$) wzrost stężenia FSH nastąpił w czerwcu ($9,0 \pm 0,3$ vs. $7,32 \pm 0,2$ ng/ml). Wzrost stężenia FSH zaobserwowano również w tym okresie w grupie G3, lecz jego wartość ($8,18 \pm 0,3$) nie różniła się istotnie od wartości notowanej w grupie G1. W końcowym okresie użytkowania mlecznego (wrzesień), stężenia FSH w grupach G2 ($13,5 \pm 1,3$ ng/ml) i G3 ($13,6 \pm 1,9$ ng/ml) były istotnie ($P < 0,01$) wyższe niż w grupie G1 ($8,8 \pm 0,9$ ng/ml).

Otrzymane wyniki wskazują, że użytkowanie mleczne owiec nie hamuje wzrostu sekrecji hormonów gonadotropowych, indukowanego przez symulację dnia krótkiego i melatoninę.

MECHANIZM DZIAŁANIA GRELINY W JAJNIKU

MECHANISM OF GHRELIN ACTION IN THE OVARY

Agnieszka Rak

*Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków,
e-mail: agnieszka.rak@uj.edu.pl*

Wstęp:

Grelina jest endogennym ligandem dla receptora GHSR (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*), którego działanie polega przede wszystkim na stymulacji wydzielania hormonu wzrostu oraz zwiększaniu łaknienia i indukowaniu otyłości. Ostatnie badania wskazują na znaczącą rolę tego hormonu w regulacji funkcji rozrodczych. Grelina jest hormonem wydzielanym przez pęcherzyk jajnikowy i reguluje procesy steroidogenezy w jajniku, stymulując proliferację komórek oraz wykazując działanie antyapoptotyczne.

Związanie greliny z funkcjonalnym receptorem, GHSR-1a aktywuje białko G, a transdukcja sygnału odbywa się przez aktywację kinazy białkowej C oraz fosfolipazy C, która hydrolizuje 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu do 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5-trójfosforanu inozytolu (IP₃). Zmiany te powodują wzrost wewnątrzkomórkowego wapnia. Liczne badania wskazują również na możliwość istnienia alternatywnych szlaków przekazywania sygnału, np. aktywacja zależnej od cAMP kinazy białkowej A lub kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK).

Cel pracy:

Biorąc pod uwagę fakt istnienia możliwości działania greliny przez aktywację szlaku fosfatydyloinozytolu, celem pracy było zbadanie mechanizmu działania tego hormonu poprzez: 1). wykazanie wpływu greliny na aktywność enzymatyczną kinazy fosfatydyloinozytolu (IP₃), katalizującą powstawanie IP₃ oraz ekspresję białka dla kinazy IP₃, 2). określenie udziału IP₃ we wpływie greliny na proliferację i apoptozę komórek pęcherzyka jajnikowego świni.

Material i Metody:

Hodowle prowadzono w postaci kokultur komórek warstwy ziarnistej oraz osłonki wewnętrznej pęcherzyka. Po 24 godzinach inkubacji, pożywkę zmieniano na świeżą, dodawano grelinę

w wzrastających dawkach: 100, 250, 500 i 1000 pg/ml.

Doś. 1 Po 15 min inkubacji, w komórkach oznaczano aktywność enzymatyczną kinazy IP₃ metodą EIA (*Enzyme ImmunoAssay*) oraz ekspresję białka metodą Western blott.

Doś. 2 Po 6 h inkubacji komórek wraz z blokerem kinazy IP₃, wortmaniną (200 μM) oznaczano proliferację komórek testem Alamar Blue oraz apoptozę, mieszając aktywność kaspazy-3 techniką kolorymetryczną i fragmentację DNA metodą EIA.

Wyniki:

Grelina w dawkach 250, 500 i 1000 pg/ml stymulowała w statystycznie istotny sposób aktywność enzymatyczną kinazy IP₃. Analiza Western blott wykazała brak wpływu greliny na ekspresję białka dla kinazy IP₃. Zaobserwowano obniżenie stymulowanej greliną (w dawkach 100, 250 i 500 pg/ml) proliferacji komórek pęcherzyka jajnikowego do poziomu kontrolnego po dodaniu inhibitora kinazy IP₃. Równolegle zanotowano odwrócenie antyapoptotycznego działania greliny. Wortmanina podana łącznie z greliną spowodowała istotnie statystyczny wzrost aktywności kaspazy-3 i zwiększenie ilości pofragmentowanych odcinków DNA do poziomu kontrolnego.

Wnioski:

Przedstawione wyniki wskazują na aktywację szlaku kinazy fosfatydyloinozytolu jako jednego z mechanizmów działania greliny na proliferację i apoptozę komórek pęcherzyka jajnikowego świni.

Praca wykonana w ramach projektu: 2748/B/PO1/2007/33.

S E S J A V

Fizjologia i patologia ciąży u człowieka

S E S S I O N V

Pregnancy physiology and pathology in humans

TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE WZAJEMNE ANGAŻUJĄCE KRÓTKIE RAMIĘ CHROMOSOM 9 JAKO CZYNNIK POWSTAWANIA ZABURZEŃ CIĄŻOWYCH U CZŁOWIEKA

RECIPROCAL CHROMOSOME TRANSLOCATIONS INVOLVING SHORT ARM OF CHROMOSOME 9 AS RISK FACTOR OF UNFAVORABLE PREGNANCY OUTCOMES

Barbara Panasiuk¹, Joanna Danik¹, Beata Stasiewicz-Jarocka¹, Ryszard Leśniewicz¹,
Bogdan Kałużewski², Maciej Kurpisz³, Alina T. Midro¹

¹Zakład Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Białystok; 15-089 Białystok, ul. Waszyngtona 13, skr. poczt. 22, mail: midro@umwb.edu.pl

²Zakład Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź; 91-425 Łódź, ul. Sterlinga 1/3,
mail: genetyka@csk.am.lodz.pl

³Zakład Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań; 60-479 Poznań
ul. Strzeszyńska 32, mail: kurpimac@man.poznan.pl

Streszczenie

Cel pracy: Celem badań było określenie prawdopodobieństwa wystąpienia różnych form zaburzeń ciąży u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW) angażujących krótkie ramie chromosomu 9 (9p) z uwzględnieniem płci nosiciela i sposobów segregacji mejozy prowadzących do nie zrównoważenia kariotypu odpowiedzialnego za zaburzenia rozwojowe.

Materiał i metodyka: Materiał do analizy stanowiły dane empiryczne i cytogenetyczne o 220 ciążach 57 nosicieli, uzyskane na bazie współpracy międzyośrodkowej. Analizę segregacyjną przeprowadzono w grupie 23 rodowodów nosicieli TCW ryzyka pojedynczego nie zrównoważenia segmentu zgrupowane wg wielkości segmentu 9p wyznaczonego przez ocenę położenia punktów złamania. Prawdopodobieństwo wystąpienia nie zrównoważonego kariotypu oszacowano metodą Stengel-Rutkowski i Stene.

Wyniki: Prawdopodobieństwo urodzenia dziecka z nie zrównoważonym kariotypem w rodzinach nosicieli TCW angażujących 9p powstałego w wyniku segregacji 2:2 i rozdziału przyległego typu 1 chromosomów mejozy wyniosło ogółem: 17.3±3.0% (28/162), natomiast prawdopodobieństwo wystąpienia nie zrównoważonego kariotypu w diagnostyce prenatalnej wyniosło ogółem: 53.3±12.9% (8/15). Wielkość prawdopodobieństwa wystąpienia nie zrównoważonego kariotypu przy urodzeniu w grupie rodzin z TCW angażujących segment. 9p22→pter wyniosła 21.5±4.6% (17/79), segment 9p13→pter - 21±9.4% (4/19), natomiast segment 9p11.2→pter - 10.9±3.9% (7/64). Ryzyko utraty ciąży na skutek ciąż obumarłych określono na 5.6±1.8% (10/162) natomiast ryzyko poronień samoistnych 13.6±2.7% (22/162). Wyniki oceny wykorzystano również do prognozy ryzyka genetycznego w wybranych translokacjach ryzyka podwójnego nie zrównoważenia.

Wnioski:

1. Wielkości prawdopodobieństwa urodzenia dziecka z nie zrównoważeniem kariotypu zależy od wielkości segmentu 9p (w obrębie krótszych segmentów 9p są wyższe w porównaniu do segmentów dłuższych).
2. Wielkości prawdopodobieństwa urodzenia dziecka z nie zrównoważeniem kariotypu zmienia się w czasie trwania ciąży jest wyższe w okresie diagnostyki prenatalnej w porównaniu do terminu porodu.
3. Wielkości ryzyka genetycznego poronień samoistnych są zbliżone dla wielkości prawdopodobieństwa urodzenia dziecka z nie zrównoważonym kariotypem.
4. Wielkości badanych wskaźników nie wykazują istotnych statystycznie różnic w zależności od płci nosiciela.

ZNACZENIE POLIMORFIZMU *HLA-C* I GENÓW *KIR* W ETIOPATOGENEZIE PORONIEŃ SAMOISTNYCH

A ROLE OF *KIR* AND *HLA-C* GENE POLYMORPHISMS IN THE ETIOPATHOGENESIS OF SPONTANEOUS ABORTIONS

Izabela Nowak¹, Wioleta Łuszczek¹, Henryk Tchórzewski², Andrzej Malinowski², Małgorzata Banasik², Ewa Barcz³, Jacek Wilczyński², Marian Gryboś⁴, Maciej Kurpisz⁵, Dorota Reszczyńska-Ślęzak⁴, Edyta Majorczyk¹, Andrzej Wiśniewski¹, David Senitzer⁶, Ji Yao Sun⁶, Piotr Kuśnierz^{1,7}

¹Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, izan@iitd.pan.wroc.pl, pkusnier@iitd.pan.wroc.pl; ²Instytut-Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź; ³Akademia Medyczna w Warszawie; ⁴Akademia Medyczna we Wrocławiu; ⁵Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań; ⁶City of Hope, National Medical Center, Duarte, USA; ⁷Akademia im. J. Długosza, Częstochowa

Cel pracy: poszukiwanie związku samoistnych poronień z genotypem *KIR* matki i *HLA-C* matki i ojca.

Material i Metody: Genomowy DNA od 149 par z samoistnymi poronieniami, w tym 91 par z poronieniami nawracającymi (co najmniej 3 poronienia) i 58 par z poronieniami sporadycznymi (1-2 poronienia) oraz od 117 par kontrolnych (co najmniej 2 zdrowo urodzonych dzieci). Multipleks PCR-SSP dla oznaczania *KIR*, PCR-SSP dla *HLA-C*.

Wyniki: Chociaż nie zaobserwowano różnic w częstościach poszczególnych genów *KIR* i alleli *HLA-C*, lecz obecność 6 genów dla hamujących receptorów *KIR* była znamienne częstsza u pacjentek z poronieniami niż w kontroli ($p=0,005$), zwłaszcza u pacjentek z poronieniami nawracającymi ($p=0,0015$). Odwrotnie, niższą częstość genotypów zawierających 6 genów dla aktywujących receptorów *KIR* zaobserwowano u pacjentek z nawracającymi poronieniami ($p<0,05$). Zaobserwowano również istotne ($p<0,05$) różnice między pacjentkami a kontrolą w częstościach kombinacji genów *KIR* z ich ligandami (*HLA-C1* i *HLA-C2*).

Wnioski: Nasze wyniki sugerują, że dla utrzymania ciąży najkorzystniejsza jest równowaga liczby genów dla aktywujących i hamujących receptorów *KIR*.

ZESPÓŁ RAFS JAKO PRZYCZYNA NIEPOWODZEŃ ROZRODU

RAFS SYNDROME AS A CAUSE OF REPRODUCTIVE FAILURES

Dorota Darmochwał-Kolarz, Bożena Leszczyńska-Gorzelak

*Katedra i Klinika Położnictwa i Perinatologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-950 Lublin, ul. Jaczewskiego 8, e-mail: dorotak@mp.pl*

Jako poronienia nawykowe określa się występujące kolejno po sobie trzy (lub więcej) poronienia ciąży przed ukończeniem 22 tygodnia u pacjentki z tym samym partnerem. U pacjentek po 35 roku życia istnieje konieczność ustalenia przyczyny i wdrożenia leczenia już po dwóch kolejnych poronieniach. Częstość występowania poronień nawykowych ocenia się na 1-5% par w wieku rozrodczym.

Ocenia się, że poronienia o etiologii immunologicznej stanowią około 65-75% poronień nawykowych. Poronienia nawykowe o podłożu auto-immunologicznym związane są z obecnością w surowicy krwi pacjentek określonych autoprzeciwciał – antyfosfolipidowych (APA), przeciwnuklearynych (ANA) i przeciwtarczycowych (ATA). Poronienia o etiologii alloimmunologicznej - nadal pozostają w grupie poronień nawykowych o niewyjaśnionej etiologii.

Zaobserwowano, że większość kobiet roniących nawykowo, u których stwierdzono zaburzenia autoimmunologiczne, nie ma innych oprócz niepowodzeń rozrodu objawów choroby autoimmunologicznej. Obserwacje te doprowadziły do sformułowania definicji jednostki chorobowej zwanej RAFS (ang. reproductive autoimmune failure syndrome). Objawy kliniczne zespołu RAFS to: ograniczone wzrastanie wewnątrzmaciczne płodu (< 34 tygodnia ciąży); ciężka preeklampsja; powikłania położnicze, takie jak: zespół HELLP, przedwczesne oddzielenie łożyska prawidłowo usadowionego; niewyjaśniona niepłodność; endometrioza; nawracające straty ciąży; obumarcie płodu (> 10 tygodnia ciąży); trzy poronienia < 10 tygodnia ciąży. Kryteria laboratoryjne zespołu RAFS to: obecność przeciwciał antyfosfolipidowych APA; gammopatie, przede wszystkim poliklonalne IgM; obecność przeciwciał przeciwnuklearynych ANA, w tym przeciwciał przeciwko histonom; obecność przeciwciał narządowo specyficznych: przeciwciał przeciwtarczycowych ATA lub przeciwciał przeciwko mięśniom gładkim ASMA.

Ponad 30% pacjentek z poronieniami nawykowymi „o niewyjaśnionej przyczynie” posiada podwyższone surowicze poziomy autoprzeciwciał: przeciwciała aPL występują u 2-20% pacjentek; przeciwciała ANA, w tym anty dsDNA, anty ssDNA, anty-SSA, anty-SSB, anty Scl70 występują u 35% pacjentek; przeciwciała ATA występują u 22-37% pacjentek (ryzyko poronienia 10-32%).

Przeciwciała ATA wywierają bezpośredni efekt toksyczny na zarodek. Uważa się, że obecność ATA jest objawem uogólnionych zaburzeń immunologicznych w następstwie defektu limfocytów T. Ponadto, przeciwciała ATA wchodzi w interakcje z aktywowanymi limfocytami T – wydzielającymi cytokiny prozapalne.

Przeciwciała przeciwnuklearyne w niskich mianach (równe lub niższe od 1:160) nie powodują zmian patologicznych. Mechanizm niepowodzeń ciążowych u pacjentek z obecnością krążących przeciwciał przeciwnuklearynych to: bezpośredni niekorzystny wpływ ANA na proces zagnieżdżania jaja płodowego; aktywacja odpowiedzi zapalnej w obrębie trofoblastu; aktywacja mechanizmów prozakrzepowych; wzrost odsetka limfocytów B-1 CD19+CD5+, produkujących poliwalentne przeciwciała w klasie IgM przeciwko hormonom i neurotransmiterom. Uważa się, że mechanizmy te mogą być odpowiedzialne za upośledzoną inwazję trofoblastu.

NADCIŚNIENIU INDUKOWANEMU CIĄŻĄ TOWARZYSZY ZMNIEJSZONA LICZBA KRAŻĄCYCH KOMÓREK PREKURSOROWYCH DLA ŚRÓDBŁONKA (EPCs)

PREGNANCY INDUCED HYPERTENSION (PIH) SYNDROME IS ACCOMPANIED BY DECREASED LEVEL OF CIRCULATING ENDOTHELIAL PRECURSOR CELLS (EPCs)

Jerzy Heimrath¹, Andrzej Czekanski², Maria Paprocka³, Agata Ledwożyw³, Danuta Duś³

¹*Katedra Ginekologii i Położnictwa, Wydział Zdrowia Publicznego, Akademia Medyczna, Wrocław*

²*Klinika Ginekologii Położnictwa i Neonatologii, Akademia Medyczna, Wrocław, andrzej.czekanski@gmail.com*

³*Zakład immunologii medycznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk, Wrocław*

CELE:

W etiologii nadciśnienia indukowanego ciążą biorą udział czynniki łożyskowe, które dostając się do krążenia macicznego prowadzą do uogólnionego uszkodzenia śródbłonka oraz nieprawidłowa inwazja trofoblastu, która skutkuje nieprawidłowym jego ukrwieniem i w konsekwencji niedożywieniem płodu.

Ostatnie badania donoszą, iż subpopulacja wywodzących się ze szpiku komórek prekursorowych dla śródbłonka (EPCs) bierze udział w procesie angiogenezy.

Celem niniejszej pracy było określenie czy ilość EPCs we krwi obwodowej ciężarnych z nadciśnieniem indukowanym ciążą różni się od ich ilości we krwi obwodowej zdrowych ciężarnych.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objętych było 18 ciężarnych z nadciśnieniem indukowanym ciążą. Grupę kontrolną stanowiło 21 ciężarnych z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego krwi. Krew żylną pobierano do próbek z heparynianem sodu bezpośrednio przed porodem. Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej izolowano i oznaczano przy pomocy przeciwciał monoklinalnych specyficznych dla markerów komórek prekursorowych dla śródbłonka: PE-conjugated anti-VEGF R2/KDR (R&D Systems) i PerCP-conjugated anti-CD34 (Becton Dickinson). Próbkę poddano cytometrii przepływowej używając aparatu FACSCalibur (Becton Dickinson). CD34⁺/VEGF R2⁺ EPCs były liczone przy użyciu CytoCount beads (Dako Cytomation) i wyrażane jako liczba komórek na 100 µL krwi.

WYNIKI I WNIOSKI

Liczba krążących EPCs (CD34⁺/KDR⁺) we krwi obwodowej ciężarnych cierpiących z powodu PIH była znacząco mniejsza w porównaniu do ciężarnych z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego.

Można przypuszczać, iż zmniejszona dostępność macicznych komórek prekursorowych dla śródbłonka może być jednym z czynników biorących udział rozwoju nadciśnienia indukowanego ciążą.

MORFOLOGIA KOSMKÓW KOŃCOWYCH ŁOŻYSK Z CIĄŻ POWIKŁANYCH HIPOTROFIĄ PŁODOWĄ

THE MORPHOLOGY OF TERMINAL VILLI OF PLACENTAS DERIVED FROM PREGNANCIES COMPLICATED WITH IUGR

Marian St. Gabryś¹, Jan J. Kuryszek²

*I Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Akademia Medyczna, ul. Chalubińskiego 3, Wrocław
Katedra Anatomii i Histologii, Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet
Przyrodniczy we Wrocławiu, Koźuchowska 5, Wrocław.*

Niska masa urodzeniowa dziecka istotnie rzutuje na jego dalszy rozwój. Powszechnie znane są dwie główne przyczyny pojawienia się u noworodka niskiej masy urodzeniowej, za którą umownie przyjęto 2500 g. Są nimi: zbyt wczesne – w stosunku do uznanego za fizjologiczne- urodzenie, lub ograniczenie wzrastania płodu w skutek różnych przyczyn. Jedną z nich jest uszkodzenie bariery łożyskowej (obszar wymiany płodowo- macicznej). Takie uszkodzenie powstaje na różnych etapach rozwoju płodu. Jednak wczesne stadia rozwoju i ukształtowania łożyska są w swej istocie niedostępne w badaniu morfologicznym, ze zrozumiałych względów etycznych.

W związku z tym, że struktury bariery łożyskowej są uformowane w strefie kosmków końcowych kosmówki, w warunkach prawidłowych umożliwia to fizjologiczną wymianę matczyno- płodową. Battistelli i wsp. stwierdzili, że kosmki końcowe łożysk w ciążach hipotroficznich były dłuższe, cieńsze i w mniejszym stopniu unaczynione, niż analogiczne struktury łożysk fizjologicznych. Istotne zmiany obserwowano również w podścielisku łożysk końcowych, gdzie stwierdzano fibrynoid (macierz mezenchymy), oraz materiał pozakomórkowy pochodzenia hematogenego. Szczytowe kosmki w strefie terminalnej – tak charakterystyczne dla fizjologicznej pokrywy trofoblastycznej kosmka- były znacząco zmniejszone. Ponadto obserwowano zmiany błony podstawnej nabłonka kosmków końcowych. Zwraca uwagę również zmniejszenie obszaru koryta naczyniowego kosmków w hipotrofii płodowej. Odzwierciedleniem klinicznym i zarazem diagnostycznym są zmiany w przepływie krwi w tym obszarze. Kinzler i Vintzileos uznają, że wspólnym elementem etiopatogenezy zahamowania wzrastania płodu jest niedokrwienie łożyska. Ten czynnik jest w równej mierze odpowiedzialny także za cały szereg przypadków przedwczesnego ukończenia ciąży. Niedokrwienie łożyska sprzyja zahamowaniu wzrastania płodu poprzez aktywizację procesów związanych z destabilizacją bariery naczyniowej. Występuje więc albo uszkodzenie bariery naczyniowej albo dochodzi do wcześniejszego starzenia się komórek śródbłonki naczyń.

Autorzy niniejszej pracy postanowili prześledzić zmiany w obszarze nabłonka kosmków końcowych, oraz mezenchymalnej tkanki podnabłonkowej graniczącej z naczyniami krwionośnymi kosmówki.

Materiał badawczy pochodził z ciąż powikłanych zahamowaniem wzrastania płodu i został zgromadzony w II Katedrze i Klinice Położniczej Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Celem prezentowanych badań jest postanowienie pytania: jak przedstawia się struktura nabłonka kosmków końcowych w ciążach hipotroficznich i ciążach fizjologicznych; oraz czy można postawić tezę, że jest to sprawczy element zahamowania wzrastania płodu.

Wykonane badania histologiczne i ultrastrukturalne wykazały zmiany w nabłonku kosmków końcowych z ciąż hipotroficznich i według autorów są one patognomiczne i swoiste, istotnie naruszające funkcje łożyska. Występuje więc wyraźna redukcja komórek cytotrofoblastu w tych łożyskach. Stwierdza się również zmiany w podścielisku kosmków, czego wyrazem jest pojawienie się stanów degradacyjnych mezenchymy, co w zasadniczy sposób rzutuje na stan naczyń krwionośnych. Stanowi to potwierdzenie naczyniowej etiopatogenezy zahamowania wzrostu łożysk pochodzących z ciąż hipotroficznich, co może wnieść istotny wkład w różnicowanie postaci i przyczyn wystąpienia IUGR.

SESJA VI

Biotechnologia i biotechnika rozrodu

SESSION VI

Biotechnology and biotechnics of reproduction

**ZAPŁODNIENIE POZAUSTROJOWE STAN OBECNY
I PERSPEKTYWY**

**ASSISTED FERTILIZATION PRESENT STATUS AND
PERSPECTIVES**

Jerzy Radwan

BRAK ABSTRAKTU

ABSTRACT NOT AVAILABLE

DOJRZEWANIE OOCYTOW *IN VITRO* U KOBIET Z ZESPOŁEM PCO

IN VITRO OOCYTE MATURATION IN WOMEN WITH SYNDROME PCO

Ricardo Faundez^{1,2}, Olga Sikorska¹, Tomasz Rokicki¹, Tomasz Dworniak¹, Yona Barak¹

¹InviMed, Europejskie Centrum Macierzyństwa, Warszawa, ²Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu, Katedry Nauk Klinicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie, ricardo_faundez@sggw.pl

Cel pracy: Dojrzewanie *in vitro* (IVM) to jedna z nowszych technik wspomaganego rozrodu. Leczenie oparte jest na pobraniu niedojrzałych kompleksów oocyt wzgórek jajonośny (OCCs), w których oocyt pozostaje w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV), bez zastosowania lub przy minimalnej stymulacji hormonalnej. W naszym ośrodku procedura ta była stosowana u pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS). Istnieje niewielka liczba doniesień odnoszących się do wpływu zespołu PCO na wynik IVM. Nasza praca miała na celu porównać wyniki dojrzewania, zapłodnienia, jakości zarodków oraz odsetek ciąż u pacjentek z zespołem PCO, które poddawane były procedurze IVM. **Materiał i metody:** Badaniem retrospektywnym objęto trzydzieści jeden pacjentek, które poddano 41 cyklom IVM w okresie od 08.07.2006 roku do 25.04.2007. Wśród nich 16 pacjentek było określonych jako grupa I (miesiączkujące pacjentki, u których obserwowano 10-20 pęcherzyków w każdym z jajników). Pozostałe 15 pacjentek określone zostały jako grupa II. Ta grupa pacjentek charakteryzowała się otyłością, brakiem miesiączek oraz ponad 20 pęcherzyków jajnikowych w każdym z jajników, stosunkiem LH>folitropina 2:1. Wszystkie pacjentki były łagodnie stymulowane przy użyciu 150 I.U. Gonal F (Serono, Szwajcaria) w 3-4 dniu cyklu. Pobranie niedojrzałych komórek jajowych wykonywano przy użyciu jednokanałowej igły do aspiracji oocytu o rozmiarze 17 (Cook, Australia), przy zmniejszonym ciśnieniu aspiracji (Dzień-1). Dojrzewanie komórek jajowych przeprowadzono zgodnie z procedurą MediCult IVM System (MediCult, Dania). Po 30 godzinach hodowli w podłożu IVM (MediCult, Dania) dojrzałe oocyty poddawano procedurze ICSI (Dzień-0). Nastrzyknięte komórki jajowe hodowano w 50 µl podłoża ISM1 (MediCult, Dania). Zapłodnienie oszacowano 18h po ICSI; podzielone zarodki transferowano w dniu 2 lub 3. Liczba pobranych oocytów, odsetki zapłodnienia i podziału, jakość zarodków oraz odsetek ciąż porównywano pomiędzy grupą I a II przy pomocy nieparametrycznego testu Chi kwadrat z korekcją według Yates'a. **Wyniki:** Przeciętny wiek pacjentek w grupie I i II był podobny (30,1 i 27,6 lat). Średnia liczba pobranych OCCs na pacjentkę była znacząco wyższa w grupie II w porównaniu do I (odpowiednio 10,7 i 6,9). Nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku OCC, które osiągnęły MII po 30h pomiędzy grupami I a II (odpowiednio 72/138 (52,2%) oraz 119/225 (52,9%)), oraz w odsetku zapłodnienia (64/82 (78,0%) a 120/146 (82,2.%)). Istotną różnicę ($p<0,05$) stwierdzono w odsetku podziału zapłodnionych oocytów w grupie I (59/63 (93,7%)), w porównaniu do II (78/93 (83,9%)). Wyższy odsetek 4 blastomerowych zarodków stwierdzono w 2 dniu w grupie I w porównaniu do grupy II (odpowiednio 35/44 zarodki (79,5%) a 36/54 (66,7%), $p<0,05$). W obu grupach wykonano 19 transferów zarodków (ET). W grupie I zakończyło się to 5 ciążami (26,3%), natomiast w grupie II 7 ciążami (36,8%). Średnia liczba transferowanych zarodków wynosiła odpowiednio 2,1 i 2,3 zarodka na pacjentkę. **Wnioski:** U pacjentek z grupy I stwierdzono wyższy odsetek dzielących się zygot oraz odsetek zarodków, które osiągnęły stadium 4-5 blastomerów w 2 dniu, w porównaniu do pacjentek z grupy II. U tych pacjentek, otyłość, brak miesiączek, oraz bardzo liczne pęcherzyki w jajnikach, mogą być związane z gorszym rozwojem zarodków po IVM. Potwierdzono pogląd, że technika IVM jest skuteczną metodą leczenia pacjentek z PCOS. Ponieważ nasze wyniki są oparte o małą liczbę pacjentów, dalsze badanie są w toku.

STRATEGIA INDYWIDUALNEGO DOBORU STYMULACJI MNOGIEGO JAJECKKOWANIA W LECZENIU NIEPŁODNOŚCI METODAMI ROZRODU WSPOMAGANEGO MEDYCZNIE

THE STRATEGY OF CHOOSING THE INDIVIDUAL PROTOCOL OF CONTROLLED OVARIAN HYPERSTIMULATION IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNIQUES

Sławomir Wołczyński

Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytet Medyczny w Białymstoku WOLCZYNSKI@SITECH.PL

Wprowadzenie agonistów, antagonistów GnRH oraz preparatów gonadotropin zrewolucjonizowało proces kontrolowanej stymulacji mnogiego jajeczkowania w programach leczenia niepłodności metodami rozrodu wspomaganego medycznie. Najczęściej stosuje się standardowe protokoły stymulacji z ustalonymi dawkami leków i czasem ich podawania. Dzięki temu uzyskano wysoką synchronizację rozwoju pęcherzyków, minimalny odsetek przedwczesnych owulacji, dobrą kontrolę nad przebiegiem cyklu i możliwość pobrania 5 – 12 komórek jajowych. Nadal nie rozwiązany problemem klinicznym pozostają nadmierne lub słabe odpowiedzi na stymulację, uzyskiwanie komórek jajowych złej jakości przy pozornie prawidłowej reakcji na stosowane leki. Trzeba brać również pod uwagę, że w najbliższym czasie zostaną przygotowane restrykcyjne regulacje prawne, które ograniczą liczbę zapładnianych komórek jajowych. Może to w sposób dramatyczny zmniejszyć skuteczność leczenia niepłodności. Wymogiem stanie się prowadzenie stymulacji tak, aby rozwijała się mała liczba pęcherzyków i można było pobrać małą liczbę komórek jajowych, ale dobrej jakości i po transferze zarodków utrzymać wysoki odsetek ciąż. Koniecznością stanie się indywidualny dobór sposobu stymulacji jajeczkowania. W pracy autor przedstawia jak zgodnie ze współczesnym rozumieniem fizjologii jajnika i wykorzystaniem osiągnięć nauk podstawowych i na ile można indywidualnie dobierać sposób kontrolowanej stymulacji mnogiego jajeczkowania.

POZAUSTROJOWE UZYSKIWANIE ZARODKÓW BYDŁA I KÓZ

IN VITRO EMBRYO PRODUCTION IN CATTLE AND GOAT

Lucyna Kątska-Książkiewicz^{1,2}

¹Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki PIB, 32-083 Balice, e-mail: lkatska@izoo.krakow.pl;

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

Znaczący postęp w technikach hodowli *in vitro*, który nastąpił w drugiej połowie ubiegłego stulecia, pozwolił na opracowanie metod pozaustrojowego uzyskiwania zarodków zarówno zwierząt laboratoryjnych jak i gospodarskich, a nawet dziko żyjących. Badania z tego zakresu są najbardziej zaawansowane u bydła. Od czasu kiedy urodziło się pierwsze cielę z zarodka uzyskanego przy użyciu kompleksowej technologii *in vitro* upłynęło już ponad 20 lat [Lu i wsp., 1988], a pierwsze w kraju cielę uzyskaliśmy w Balicach już przeszło 18 lat temu [Kątska i wsp., 1991]. Obecnie możemy uzyskać ponad 90% dojrzałych *in vitro* oocytów, ponad 80% zapłodnionych oocytów i ponad 70% oocytów podejmujących po zapłodnieniu rozwój zarodkowy. Jednakże, mimo znacznego udoskonalenia technik hodowli zarodków, znaczna ich część nie osiąga bardziej zaawansowanych stadiów rozwoju przedimplantacyjnego, zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i po przeniesieniu do dróg rodnych biorczyń, i nawet w najbardziej optymalnych warunkach tylko 30 do 40% użytych do zapłodnienia oocytów wykazuje pełny potencjał rozwojowy. Przyczyny tej redukcji zdolności rozwojowych są dość złożone. W referacie omówione zostaną próby zwiększenia kompetencji rozwojowych dojrzewających *in vitro* oocytów, zdolności zapładniającej plemników i kompetencji rozwojowych uzyskanych *in vitro* zarodków. Metoda pozaustrojowego uzyskiwania zarodków bydłecy jest wykorzystywana w wielu krajach w celach komercyjnych, dla zwiększenia liczby cieląt od dawców cennych pod względem genetycznym. W połączeniu z techniką przyżyciowego pobierania oocytów (OPU) technologia IVP służy jako alternatywna lub integralna metoda programów hodowlanych MOET. Dla przykładu: w Europie w 2006 r. wyprodukowano w celach komercyjnych ogółem 13942 zarodki, z których 7734 pochodziło z OPU, a 6208 z oocytów pozyskiwanych z jajników bydła rzeźnego. Z tych zarodków 6845 przeniesiono zsynchronizowanym biorczynom – stanowiło to ogółem 7,2% ogółu zarodków użytych do transferu. Na podobnym poziomie ten odsetek utrzymuje się od kilku lat [dane AETE, 23 Annual Meeting, Alghero, Sardinia, 2007].

U kóz, podobnie jak u bydła, możliwe jest uzyskanie od około 70 do nawet 90 % dojrzałych *in vitro* oocytów, z których po zapłodnieniu pozaustrojowym od 50 do 70 % podejmuje rozwój zarodkowy. Prowadzone przez nas badania doprowadziły do znacznego udoskonalenia metody zapłodnienia pozaustrojowego, tj. do opracowania skutecznego sposobu kapacytacji, zarówno świeżego jak i mrożonego nasienia kozła [Kątska-Książkiewicz i wsp., 2002; 2004; 2007]. Użycie opracowanej przez nas metody pozwala na uzyskanie zarodków zdolnych do prawidłowego rozwoju *in vitro* (ponad 30 % zygot rozwija się do stadium blastocysty) oraz pełnego rozwoju *in vivo* [Kątska-Książkiewicz i wsp., 2002; 2004; 2007; 2008]. W połączeniu z niechirurgicznym uzyskiwaniem niedojrzałych oocytów (technika LOPU - laparoscopic ovum pick up) metoda pozaustrojowego uzyskiwania zarodków kozich może znaleźć zastosowanie aplikacyjne, podobnie jak to ma miejsce u bydła [Kątska-Książkiewicz i wsp., 2008].

POTENCJE ROZWOJOWE ZARODKÓW ZWIERZĄT GOSPODARSKICH *IN VITRO*

THE DEVELOPMENT POTENTIAL OF FARM ANIMAL EMBRYOS

Anna Maria Duszewska^{1,2}

¹ Zakład Histologii i Embriologii, Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa;

² Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, 05-552 Wólka Kosowska

Uzyskiwanie zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro* oparte jest na procedurze obejmującej dojrzewanie *in vitro* oocytów, zapłodnienia *in vitro* dojrzałych oocytów oraz hodowlę zarodków *in vitro*. Potomstwo po przeniesieniu do bioreakcji zarodków uzyskanych *in vitro* otrzymano u owiec, bydła, świni i kozy. Natomiast u koni niniejsza biotechnika nastręcza wiele problemów, choć uzyskano już źrebięta. Procedura uzyskiwania zarodków zwierząt gospodarskich *in vitro* stosowana jest obecnie na szeroką skalę i uważana jest za jedną z najważniejszych biotechnik w rozrodcie, bowiem łączy hodowlę zwierząt z biotechnologią i medycyną.

Jakkolwiek w większości przypadków potomstwo otrzymane po przeniesieniu zarodków uzyskanych *in vitro* nie różni się ani anatomicznie, ani fizjologicznie od potomstwa otrzymanego w warunkach naturalnych to jednak zdolności rozwojowe zarodków uzyskanych *in vitro* są niższe w porównaniu z zarodkami *in vivo*. Po przeniesieniu do bioreakcji zarodków zwierząt gospodarskich uzyskanych *in vitro* odsetek potomstwa jest niższy niż zarodków *in vivo*. Wynika to z niedoskonałych warunków *in vitro* podczas dojrzewania, a następnie zapłodnienia oraz hodowli, co może prowadzić do obniżenia potencji rozwojowych zarodków lub do ich śmierci. Spośród rodzajów śmierci wyróżnia się: martwicę, starzenie, apoptozę, choć również może być obserwowana autofagia oraz katastrofa mitotyczna. Do zaburzeń w rozwoju zarodków należy zaliczyć: zmieniony metabolizm, nieprawidłowe włączenie się genomu zarodkowego, wadliwą ekspresję genów, zaburzenia chromosomowe oraz wystąpienie zaburzeń w epigenetycznych modyfikacjach.

Zaburzenia mogą ujawnić się podczas rozwoju zarodków *in vitro* lub też znacznie później, czyli w rozwoju przed- i poimplantacyjnym, a także w rozwoju postnatalny osobników. Mogą one prowadzić do śmierci lub też do wystąpienia: wodogłowia, niedorozwoju lub uszkodzenia mózgu, nieprawidłowego rozwoju kończyn, powiększenia serca i wątroby, wystąpienia problemów z oddychaniem, jak również wystąpienia syndromu dużego potomstwa.

MODYFIKACJE OOCYTÓW I ZARODKÓW ŚWINI DLA CELÓW BIOTECHNOLOGICZNYCH

MODIFYING PORCINE OOCYTES AND EMBRYOS: IMPLICATIONS FOR BIOTECHNOLOGY

Barbara Gajda

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Krakowska 1
32-083 Balice/Kraków, e-mail: bgajda@izoo.krakow.pl*

Oocyty i zarodki ssaków posiadają własną gatunkową specyfikę. Typowym przykładem są oocyty i zarodki świni, które na tle innych gatunków ssaków, charakteryzują się wysoką zawartością związków tłuszczowych zgromadzonych w cytoplazmie głównie w postaci kropli lipidowych. Krople lipidowe składają się z mieszaniny różnych typów lipidów otoczonych pojedynczą warstwą fosfolipidów o zróżnicowanym składzie. Zawarte w kroplach lipidy stanowią element struktury błony komórkowej oraz cytoplazmy, jak również pełnią ważną rolę jako źródło energii niezbędne do prawidłowego rozwoju komórki jajowej. Jednak z punktu widzenia kriokonserwacji ich obecność w komórkach zarodkowych jest niekorzystna.

W referacie przedstawione są aktualne możliwości modyfikacji oocytów i zarodków świni między innymi za pomocą czynników fizycznych takich jak wirowanie czy zwiększone ciśnienie, chemicznych takich jak cytochalazyna B czy D, jak też manipulacji mikrochirurgicznych czy hodowli in vitro oraz implikacje biotechnologiczne tych zabiegów.

NOWE METODY TRANSFORMACJI OOCYTÓW I ZYGOT W TRANSGENEZIE ZWIERZĄT HODOWLANYCH

NEW METHODS OF OOCYTES AND ZYGOTES TRANSFORMATION IN FARM ANIMALS TRANSGENESIS

Jacek Jura

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
ul Krakowska 1, 32-083 Balice, jjura@izoo.krakow.pl*

W wykładzie omówiono nowe metody transformacji zygot i zarodków zwierząt hodowlanych w odniesieniu do standardowej mikroiniekcji DNA.

Mikroiniekcja „wielowektorowa”: technika polegająca na jednoczesnym wstrzykiwaniu dwu lub więcej wymieszanych konstrukcji genetycznych. Stwarza możliwość uzyskania integracji i ekspresji jednego, rzadziej wszystkich wprowadzonych genów.

„Transgeneza piętrowa”: metoda polegająca na wprowadzaniu serii konstrukcji genowych, które mają za zadanie spowodowanie kolejnych modyfikacji w łańcuchu świadomie zaplanowanych zmian u transgenicznym osobników - np. w celu modyfikacji układu immunologicznego. Kolejne wektory wprowadzane są do komórek jajowych uzyskanych od transgenicznych samic krytych bądź inseminowanych nasieniem transgenicznych samców. Korzyścią takiego postępowania jest zwiększenie liczby osobników transgenicznych z wcześniej utrwaloną cechą oraz możliwość uzyskania osobników wyposażonych w kolejną, pożądaną cechę.

Wykorzystanie najnowszej generacji konstrukcji genowch – wektorów lentiwirusowych. Wektory lentiwirusowe nie mają zdolności do samoistnego przenikania przez osłonkę przejrzystą zapłodnionych komórek jajowych, wektory genetyczne bazujące na nich, należy wprowadzić do przestrzeni okołozółtkowej. Efektywność zastosowania tych nośników jest bardzo wysoka. Wektory lentiwirusowe mają kilka bardzo ważnych cech: mogą przenosić kilka genów (do trzech jednocześnie), co pozwala na spowodowanie szeregu określonych, współzależnych zmian w genomie biorcy. Charakteryzują się umiarkowaną ekspresją genów w całym organizmie gospodarza i indukują niewielką odpowiedź immunologiczną. W rezultacie połączenia z materiałem genetycznym gospodarza powodują długoterminową ekspresję genu.

Z literatury wynika, że metoda wykorzystująca tego typu nośniki egzogennej informacji genetycznej, ze względu na jej wysoką efektywność i możliwość wprowadzania więcej niż jednego genu, w niedalekiej przyszłości stanie się wiodącą metodą w produkowaniu zwierząt transgenicznych.

S E S J A V I I

**Żywieniowe i środowiskowe uwarunkowania procesów rozrodu
u ludzi i zwierząt**

S E S S I O N V I I

**Environmental and nutritional conditioning of reproductive
processes in humans and animals**

WPŁYW FITOESTROGENÓW NA WYDZIELANIE ANDROGENÓW NADNERCZOWYCH MOŻLIWOŚĆ ZABURZEŃ ROZRODU ZWIERZĄT

THE INFLUENCE OF PHYTOESTROGENS ON ADRENAL ANDROGENS RELEASE - POSSIBILITY OF ANIMAL REPRODUCTION DISORDERS

Barbara Kamińska, Marek Opalka, Luiza Dusza

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

Fitoestrogeny to zróżnicowana grupa związków pochodzenia roślinnego. Substancje te są obecne w całych roślinach, ich nasionach oraz przetworach z nich pochodzących. Bogate w fitoestrogeny są rośliny motylkowe (soja, koniczyna czerwona, lucerna), które są podstawowym składnikiem pasz dla zwierząt gospodarskich a także wchodzi w skład diety ludzi. Przetwory soi, będące źródłem wysokiej jakości białka, powszechnie stosuje się w przemysłowych mieszankach dla zwierząt domowych oraz w dietach wegetariańskich. Produkty te (śruta poekstrakcyjna, koncentraty białka czy izolowane białko soi) zawierają znaczne ilości izoflawonów (jednej z klas fitoestrogenów), w tym genisteiny i daidzeiny. Częsteczki tych fitoestrogenów zawierają pierścień fenolowy, co powoduje ich podobieństwo strukturalne do estrogenów zwierzęcych. Konsekwencją takiej budowy chemicznej jest ich aktywność estrogenna i możliwość wpływu na organizm zwierząt. Szacuje się, że fitoestrogeny mają ponad tysiąc razy słabsze działanie niż endogenne (zwierzęce) hormony o budowie steroidowej – estradiol i estron. Jednak zawartość estrogenów roślinnych w pokarmie ludzi i zwierząt może być na tyle znacząca, że zrekompensuje ich słabszą aktywność biologiczną.

Wpływ fitoestrogenów na procesy rozrodu zwierząt jest przedmiotem badań od ponad pół wieku. W ostatnich latach opublikowano wyniki szeregu doświadczeń, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, próbujących wyjaśnić mechanizmy i efekty działania tych związków w układzie rozrodczym różnych gatunków.

Dotychczas stosunkowo niewiele uwagi poświęcano wpływowi fitoestrogenów na funkcjonowanie kory nadnerczy u ludzi i zwierząt a mechanizm ich działania jest słabo zbadany. Badania z zastosowaniem różnych izoflawonów wskazują na hamujący wpływ fitoestrogenów na wydzielanie glikokortykoidów (kortyzolu lub kortykosteronu). Z drugiej strony wyniki doświadczeń *in vitro* wykazały stymulujące działanie fitoestrogenów na sekrecję androgenów nadnerczowych (dehydroepiandrosteronu, siarczanu dehydroepiandrosteronu i androstendionu). Obniżanie wydzielania glikokortykoidów przez fitoestrogeny może być w warunkach *in vivo* niwelowane przez zwiększoną sekrecję ACTH. W konsekwencji przywracana jest równowaga w produkcji kortykoidów a podwyższona przez fitoestrogeny produkcja androgenów nadnerczowych dodatkowo wzrasta pod wpływem ACTH. Obecnie wiadomo, że mimo stosunkowo słabej aktywności, androgeny nadnerczowe, będące prekursorami steroidów płciowych (estradiolu i testosteronu), mogą w pewnych warunkach zaburzać procesy rozrodu ludzi i zwierząt. Podwyższone stężenia androgenów nadnerczowych są obserwowane u kobiet z zespołem jajników policystycznych (PCOS). Nieprawidłowe koncentracje androgenów stwierdza się także u zwierząt z cystami jajnikowymi. Dlatego przypuszcza się, że również u nich androgeny nadnerczowe mogą generować powstawanie cyst i sprzyjać bezpłodności.

Niewykluczone jest zatem, że niektóre oddziaływania fitoestrogenów na organizm zwierząt (w tym układ rozrodczy) zachodzą za pośrednictwem androgenów wydzielanych przez nadnercza.

Praca finansowana przez MNiSW (projekty badawcze: N N311 274034 oraz 522-0206.0206)

WPLYW DŁUGOTERMINOWEJ INTOKSYKACJI ZEARALENONEM NA KONCENTRACJĘ PROGESTERONU I ESTRADIOLU 17 β W OSOCZU KRWI SUK

INFLUENCE OF LONG LASTING ZEARALENONE INTOXICATION ON PROGESTERONE AND 17 β ESTRADIOL IN BITCHES BLOOD PLASMA

Magdalena Gajęcka, Tomasz Janowski¹, Ewa Jakimiuk, Łukasz Zielonka,
Małgorzata Podhalecz-Dzięgielewska¹, Kazimierz Obremski, Maciej Gajęcki

Zespół Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział
Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn,

e-mail: mgaj@uwm.edu.pl

¹Zespół Rozrodu Zwierząt, Katedra Nauk Klinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn.

W pracy oceniano wpływ długoterminowej eksperymentalnej intoksykacji zearalenonu na koncentrację zearalenonu, progesteronu i estradiolu 17 β w osoczu krwi suk. Zearalenon (ZEA) jest niesteroidową mikotoksyną o działaniu estrogennym, jak również specyficznym hormonem regulującym rozmnażanie płciowe *Fusarium* (stadium płciowe - *Gibberella zeae*). Do organizmów zwierząt związek ten dostaje się wraz z zanieczyszczoną paszą (karmą). ZEA jest w znacznej mierze (80-85%) szybko wchłaniany z przewodu pokarmowego oraz metabolizowany

Celem badań było określenie wpływu długoterminowej, doustnej intoksykacji ZEA na koncentrację progesteronu, estradiolu 17 β i samego zearalenonu w osoczu krwi suk.

Materiały i metody

Doświadczenie zostało przeprowadzone na 9-ciu dojrzałych płciowo, klinicznie zdrowych sukach w fazie *anestrus*, w wieku 1-3 lata, które zostały podzielone na 2 grupy doświadczalne oraz kontrolną. Zwierzęta grup doświadczalnych otrzymywały odpowiednio 25 μ g/kg m.c. lub 50 μ g/kg m.c. ZEA *per os* przez okres 100 dni. W osoczu krwi oznaczano koncentrację ZEA i obu hormonów w odstępach tygodniowych. Poziom progesteronu i estradiolu 17 β oznaczano metodą radioimmunologiczną, w dwóch powtórzeniach. Roztwory przeciwciał antyprogesteronowych oraz antyestradiolowych otrzymane od prof. B. Hoffmana z Uniwersytetu im. J.Liebiega w Giessen. Oznaczanie ZEA w osoczu krwi wykonane zostało, stosując łączne techniki separacji z użyciem kolumnienek powinowactwa immunologicznego, i wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluoroscencyjną.

Wyniki

Obecność ZEA stwierdzono już w 30 minucie, a także przez cały okres eksperymentu. Wysoką koncentrację ZEA obserwowano w 6-9 tygodniu (od 9,34 do 124,33 ng/ml.). Stanowi intoksykacji towarzyszyły również zaburzenia w koncentracji progesteronu (do 25-30 ng/ml) zależnie od dawki ZEA oraz wzrastającą koncentrację estradiolu 17 β (do 33 pg/ml). Tego rodzaju zaburzenia hormonalne są podobne do stwierdzanych podczas różnych stanów patologicznych w drogach rodnych suk.

Wnioski

Z badań długoterminowej eksperymentalnej intoksykacji ZEA suk podczas fazy *anestrus*, można przypuszczać, że mająca miejsce mikotoksykoza zearalenonowa powoduje zmiany w koncentracji estradiolu 17- β i progesteronu zależnie od dawki ZEA otrzymywanego przez zwierzęta. Niższa dawka ZEA powodowała zmiany koncentracji badanych hormonów do wartości podobnych podczas torbielowatego rozrostu błony śluzowej macicy. Podczas intoksykacji wyższą dawką ZEA powstawała sytuacja hormonalna podobna do występującej podczas samorzutnej postaci ropomacicza.

WPLYW CHLOROORGANICZNYCH KSENOBIOTYKÓW NA CZYNNOŚĆ MACICY I JAJNIKA KROWY: MECHANIZM DZIAŁANIA

EFFECT OF CHLORORGANIC XENOBIOTICS ON FUNCTION OF UTERUS AND OVARY IN COW: MECHANISM OF ACTION

Michał Wróbel, Jarosław Młynarczuk, Jan Kotwica

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

E-mail: wrobel@pan.olsztyn.pl

Wraz z rozwojem gospodarczym, do środowiska przeniknęło szereg substancji chemicznych (tzw. ksenobiotyków), wśród nich polichlorowane bifenyle (PCBs) - odpady przemysłowe oraz dwuchlorodwufenylotróchloroetan (DDT), wciąż wykorzystywany jako insektycyd. Lipolityczna natura oraz odporność na biodegradację tych substancji, umożliwiają im akumulację w tkankach zwierząt i ludzi. Substancje te naśladując działanie naturalnych regulatorów funkcjonowania układu rodowego, mogą istotnie upośledzić procesy rozrodu, podczas gdy warunkiem osiągnięcia sukcesu rozrodczego, jest prawidłowe funkcjonowanie oraz niezakłócone współdziałanie macicy, jajowodu i jajnika. Dlatego określenie mechanizmu działania ksenobiotyków na poziomie komórki, może stanowić podstawę dla pełniejszego zrozumienia wpływu skażenia środowiska na rozród. Ważne jest to zarówno ze względów poznawczych, jak i ekonomicznych.

Wpływ PCBs i DDT był badany przy użyciu modelu *in vitro*, który naśladował (do 72 godz.) ich oddziaływanie w środowisku. Użyte dawki pokrywały się z wielkościami oznaczanymi w tkankach żywych organizmów (0.1-10 ng/ml) oraz imitowały efekt incydentalnego skażenia środowiska (100 ng/ml). Zarówno PCBs oraz DDT upośledzały aktywność motoryczną macicy krowy, zwiększając siłę podstawowego i stymulowanego OT skurczu skrawków mięśniówki, pobranych od cyklicznej lub ciężarnej samicy. Mechanizm obserwowanego efektu ksenobiotyków na tkankę rozpatrywano na poziomie komórkowym. Badane ksenobiotyki nie wykazały cytotoksycznego wpływu na komórki: endometrium, miometrium, lutealne i granulozy. Dlatego obserwowany wpływ PCBs i DDT nie mógł być pochodną obniżonej przeżywalności komórek, pobranych z macicy i jajnika. Wzrost podstawowej kurczliwości mięśniówki może być wynikiem zwiększenia mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów wapnia oraz podwyższonej sekrecji PGF_{2α}, co wykazano w miometrium pod wpływem działania PCBs. Zwiększenie przez PCBs i DDT sekrecji PGF_{2α} oraz brak wpływu lub zmniejszenie uwalniania PGE₂ z endometrium, a więc zaburzenie proporcji między PGF_{2α} i PGE₂, może dodatkowo wzmocnić ten efekt. Opisane zwiększenie sekrecji PGF_{2α} z tkanek macicy, może zwrótnie wpłynąć na jajnik stymulując uwalnianie OT, a więc kolejnego czynnika stymulującego kurczliwość mięśniówki. Zławszcza, iż PCBs i DDT również bezpośrednio zwiększały sekrecję OT z komórek lutealnych i granulozy jajnika. Natomiast OT może zwrótnie zwiększyć uwalnianie PGF_{2α} z macicy. To sugeruje, że ksenobiotyki mogą być uznane za czynniki luteolityczne. U podstaw przedstawionego efektu komórkowego leżą zaburzenia, wywołane na poziomie molekularnym. PCBs i DDT, zwiększały ekspresję genów NPI/OT oraz PGA, związanych z syntezą i potranslacyjną przemianą OT w komórkach granulozy i lutealnych jajnika. Mimo, że nie wykazano podobnego wpływu PCBs na ekspresję genów dla enzymów (COX-2, PGFS) związanych z syntezą PGF_{2α} w macicy, to zablokowanie syntezy prostaglandyn przez indometacynę, blokera COX-2, wyraźnie znosiło stymulujący efekt PCBs na kurczliwość miometrium.

Podsumowując, PCBs, DDT i jego metabolity już w śladowych ilościach upośledzają aktywność motoryczną macicy oraz czynność jajnika. Zachodzi to poprzez zakłócenie zarówno sekrecji jak i syntezy szeregu hormonów oraz na drodze zakłócenia wewnątrzkomórkowego przekazu informacji.

Praca wykonana w ramach grantu N308 023 31/1970

METABOLIZM PCB3 W JAJNIKU: AKTYWACJA CYP1A1,CYP2B1,CYP1A2

METABOISM OF PCB3 IN THE OVARY. ACTIVATION OF CYP1A1,CYP2B1,CYP1A2

Anna Ptak, Ewa Ł. Gregoraszczyk

*Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Ingardena 6, 30-060 Kraków.
e-mail: aptak@zok.iz.ujd.edu.pl*

Wstęp: W przeciwieństwie do wysoko chlorowanych kongenerów PCB nazywanych „trwałymi kongenerami” kongenery nisko chlorowane, których przedstawicielem jest PCB3, określane mianem „epizodycznych kontenerów” ulegają szybkiemu metabolizmowi. W metabolizm tych związków zaangażowane są cytochromy z rodziny CYP1, CYP2 i CYP3, biorące udział w przemianach zarówno endogennych jak i egzogennych substratów. Wyniki naszych badań wskazujące na wyższą aktywność estrogenną metabolitów PCB3 w porównaniu do związku wyjściowego sugerują, że metabolizm tych związków nie prowadzi do ich dezaktywacji.

Cel pracy: określenie potencjalnych zdolności komórek jajnikowych do metabolizmu ksenoestrogenów.

Materiały i metody: Kokultury komórek warstwy ziarnistej oraz osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świni hodowano przez 48 godzin w obecności PCB3 (6ng/ml) lub 17β-estradiolu (E2),(6ng/ml). Przeprowadzono trzy eksperymenty: Exp1 miał na celu zbadanie aktywności enzymów metabolizujących. Aktywność enzymu CYP1A1 oznaczana metodą EROD, CYP1A2 metodą MROD oraz CYP2B1 metoda PROD; Exp2 miał na celu zbadanie aktywacji receptorów AhR oraz ERα i ERβ pod wpływem PCB3. Ekspresje receptorów badano metodą Western Blot; Exp3 miał na celu określenia udziału receptorów AhR i ER w aktywacji CYP1A1. W badaniach tych użyto 4-hydroksytamoxifenu (TMX, 10μM) inhibitora receptorów estradiolowych (ER) oraz α-naftoflawonu (ANF, 10μM) inhibitora receptorów AhR.

Wyniki: Wykazano aktywność CYP1A1>CYP2B1>CYP1A2 w jajniku świni. Wykazano porównywalną do E2 aktywację i enzymu CYP1A1 i CYP2B1 pod wpływem PCB3. Badając mechanizm aktywacji enzymu CYP1A1 w jajniku zaobserwowano niemal całkowite wygaszenie aktywności tego enzymu pod wpływem ANF, zarówno w komórkach kontrolnych jak i traktowanych badanymi czynnikami. Ponadto, obserwowano spadek aktywności CYP1A1 pod wpływem TMX. Nie obserwowano wpływu PCB3 na ekspresję receptora AhR i ERα, natomiast obserwowano spadek ekspresji białka dla ERβ.

Wnioski: Rezultaty otrzymane wskazują na: 1) istnienie w pęcherzyku jajnikowym aktywnych cytochromów CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 2) możliwość lokalnego metabolizmu PCB3 w pęcherzyku jajnikowym poprzez cytochromom CYP1A1, CYP2B1 3) brak udziału receptorów AhR w indukcja cytochromu CYP1A1 przez PCB3, 4) prawdopodobieństwo działania PCB3 jako agonisty receptora ERβ.

Finansowane przez: projekt badawczy numer 0431/PO4/04/27 oraz DS./BiNoZ/IŻ/KF/772/2007

WPLYW AROCLORU 1254 ORAZ ANALOGU GNRH NA SEKRECJĘ LH I OWULACJĘ U SAMIC KARASIA (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO* BLOCH)

EFFECT OF AROCLOR 1254 AND GNRH-A ON THE LH SECRETION AND OVULATION IN FEMALE GOLDFISH (*CARASSIUS AURATUS GIBELIO* BLOCH)

Magdalena Socha¹, Mirosława Sokołowska-Mikołajczyk¹, Tomasz Mikołajczyk¹,
Paweł Szczerbik¹, Jarosław Chyb¹, Piotr Epler¹

¹Katedra Ichtiobiologii i Rybactwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie
ul. T. Spiczkowa 6, 30-199 Kraków, e-mail: msocha@ar.krakow.pl

Cel pracy: Podjęte eksperymenty miały na celu wyjaśnić, czy *in vivo* testowane dawki Arocloru 1254 podawanego dootrzewnowo lub dojelitowo wpłyną na wydzielanie gonadotropiny dojrzewania i owulację u dojrzałych płciowo samic karasia poddanych kilkudniowej ekspozycji na polichlorowane bifenyle (PCB).

Material i metody: Doświadczenia wykonano w okresie okołotarłowym (czerwiec) na 80 dojrzałych płciowo samicach karasia. Aroclor 1254 podawano dootrzewnowo lub dojelitowo w odpowiednich koncentracjach (0.01; 0.1 oraz 1 mg kg⁻¹ masy ciała) przez 3 dni. Następnie pobrano krew i zainiektowano GnRH (czas „0”). Kolejne próby krwi pobierano po 6, 12 i 24 godzinach w każdym eksperymencie. Poziom LH określono używając metody ELISA.

Wyniki: Dojelitowe podanie najniższej dawki Arocloru (0,01 mg kg⁻¹ masy ciała) spowodowało statystycznie istotny wzrost spontanicznej (czas „0”) sekrecji gonadotropiny dojrzewania w porównaniu do grupy kontrolnej. Iniekcja analogu GnRH spowodowała wzrost wydzielania LH (po 6, 12 oraz 24 godzinach), ale wzrost ten nie różnił się statystycznie pomiędzy grupami eksperymentalnymi a kontrolną. W drugim doświadczeniu po dootrzewnowym podaniu Arocloru nie stwierdzono zmian w spontanicznej sekrecji LH (czas „0”), natomiast po 6 godzinach od iniekcji GnRH stwierdzono statystycznie istotny spadek stymulowanego wydzielania LH we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej. W dalszej części eksperymentu (12 i 24 godziny) nie stwierdzono istotnych różnic w ilości uwolnionego LH. W obydwu doświadczeniach nie stwierdzono istotnego wpływu podawanych związków na owulację u samic karasia.

Wnioski: Uzyskane wyniki (stymulacja oraz hamowanie) w doświadczeniach *in vivo* nie wskazują jednoznacznego działania Arocloru 1254 na wydzielanie LH u samic karasia w okresie okołotarłowym. Jednak obserwowane zmiany w sekrecji gonadotropiny dojrzewania sugerują, że polichlorowane bifenyle mogą zakłócać rozród ryb zaburzając regulację hormonalną m.in. na poziomie przysadki mózgowej.

ROLA LEPTYNY W REGULACJI OSI PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWO-JAJNIKOWEJ W CZASIE CYKLU I CIĄŻY U ŚWINI

ROLE OF LEPTIN IN THE REGULATION OF HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS DURING THE OESTROUS CYCLE AND PREGNANCY IN THE PIG

Gabriela Siawrys, Nina Smolińska, Tadeusz Kamiński, Jadwiga Przła

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

Leptyna, jest hormonem białkowym (16 kDa) kodowanym przez gen *ob*. Głównym jej źródłem jest biała tkanka tłuszczowa, ale jest również wytwarzana przez mózg, mięśnie szkieletowe, żołądek i układ rozrodczy. Badania ostatnich kilkunastu lat wykazały, że hormon ten bierze udział w kontroli wielu procesów fizjologicznych związanych z rozrodem, między innymi przyspiesza dojrzewanie płciowe, wpływa na płodność, implantację zarodka i rozwój płodu. Leptyna kontroluje funkcje rozrodcze działając poprzez oś podwzgórze-przysadka-gonady (HPG), o czym świadczy zlokalizowanie jej receptorów na wszystkich poziomach tej osi. Wykazano jej bezpośredni wpływ na uwalnianie GnRH w podwzgórzu, gonadotropin w przysadce i steroidów w jajniku.

Stosując metody RT-PCR i hybrydyzację *in situ*, zlokalizowano transkrypt genu leptyny i jej receptora w strukturach osi HPG u świni w fazie lutealnej cyklu rujowego oraz w okresie wczesnej ciąży i wykazano że poziom ekspresji tych genów jest zróżnicowany. Dotychczas nie zbadano czy u tego gatunku w strukturach osi HPG występuje ekspresja białka leptyny i jej receptora. Stąd celem badań podjętych przez nasz zespół było określenie poziomu ekspresji białka leptyny oraz izoformy długiej receptora leptyny (OB-Rb) w podwzgórzu [obszarach: podstawno-przyśrodkowym (MBH), przedwzrostkowym (POA), szypuła wyniosłość pośrodkowa (SME)], przysadce (płat przedni – AP i nerwowy – NP) i jajniku (ciałko żółte – CL, zrąb – OS) svin w fazie lutealnej cyklu rujowego (10-12 i 14-16 dzień) i wczesnej ciąży (14-16 i 30-32 dzień).

Przy użyciu metody Western blot, wykazano że u świni leptyna jest produkowana w podwzgórzu (MBH, POA, SME), przysadce (AP, NP), ciałku żółtym i zrębie jajnika w badanych okresach cyklu rujowego i ciąży. Stwierdzono również ekspresję białka receptora OB-Rb we wszystkich badanych tkankach pobranych od svin cyklicznych i ciężarnych. Zaobserwowano że poziom ekspresji białka leptyny oraz jej receptora w badanych tkankach świni ulega fluktuacji w czasie cyklu i ciąży. Interesujące okazały się porównania poziomu ekspresji białka leptyny/OB-Rb w strukturach osi HPG pomiędzy ciążą i cyklem rujowym. W odniesieniu do ekspresji białka leptyny, wykazano istotnie niższą koncentrację białka w MBH i NP podczas ciąży w porównaniu do cyklu. Odwrotną zależność zaobserwowano w POA, SME, AP i OS. Natomiast w CL stwierdzono zróżnicowane poziomy tej ekspresji pomiędzy ciążą i cyklem. W odniesieniu do ekspresji białka OB-Rb, wyższy poziom białka wykazano w SME, NP i OS w ciąży niż w czasie cyklu. Z kolei w AP i CL zauważono istotne obniżenie. W MBH i POA poziom ekspresji tego białka był zróżnicowany pomiędzy okresami ciąży i cyklu.

Przedstawione badania wskazują że u świni leptyna jest produkowana w strukturach osi HPG, a obecność funkcjonalnego receptora sugeruje jej udział w auto/parakrynnnej regulacji funkcjonowania podwzgórza, przysadki i jajnika w fazie lutealnej cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Ponadto zróżnicowane poziomy ekspresji białka leptyny i OB-Rb w czasie cyklu i ciąży przemawiają za udziałem estrogenów i/lub LH w regulacji ekspresji tych białek, ale to wymaga dalszych badań.

Praca finansowana z grantu KBN - projekt nr PBZ KBN-084/P06/2002

WPLYW ZMIANY OŚWIETLENIA W RYTMIE DZIEŃ/NOC OKRESU LETNIEGO NA WYTWARZANIE TLENKU WĘGLA W SIATKÓWCE OKA I STĘŻENIE HORMONÓW PŁCIOWYCH WE KRWI OBWODOWEJ U SAMCA KRZYŻÓWKI ŚWINI DOMOWEJ I DZIKA

THE INFLUENCE OF LIGHTING CHANGES ON CIRCADIAN PRODUCTION OF CARBON MONOXIDE IN THE RETINA AND SEX HORMONES CONCENTRATION IN SYSTEMIC BLOOD OF DOMESTIC PIG AND WILD BOAR CROSSBREED IN SUMMER

Marek Koziorowski¹, Stanisława Stefańczyk-Krzymowska², Ewelina Kowal¹, Przemysław Gilun², Anna Tabęcka-Łonczyńska¹, Marian Kamiński³.

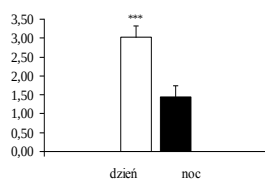
¹Zakład Fizjologii i Rozrodu Zwierząt, Uniwersytet Rzeszowski, 35-959 Rzeszów, ul. Rejtana 16C, mkoziro@univ.rzeszow.pl; ²Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, 10-747 Olsztyn, ul. Tuwima 10³. Katedra Chemii Analitycznej, Politechnika Gdańska, 80-952 Gdańsk ul. Narutowicza 11/12

Prezentowane wyniki są efektem pierwszego etapu rozległych badań, które mają odpowiedzieć na pytania: 1/ czy informacja o zmianie oświetlenia w rytmie dzień/ noc i w sezonie może docierać do ośrodkowego układu nerwowego samca drogą humoralną opartą na przenikaniu w okołoprzysadkowym kompleksie naczyniowym do krwi tętniczej tlenku węgla (CO), wytwarzanego w siatkówce oka pod wpływem światła, oraz 2/ czy CO jako humoralny nośnik informacji może wpływać drogą genomową na syntezę hormonów gonadotropowych i steroidowych. Przedstawione wyniki dotyczą wpływu światła dziennego na wytwarzanie CO w siatkówce oka oraz stężenie hormonów płciowych we krwi obwodowej.

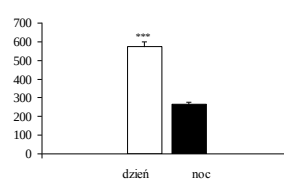
Materiał i metody:

Do badań użyto 4 knurki świniodzika od których pobrano próby krwi żyłnej odpływającej z oka, przez kaniulę wprowadzoną przez żyłę kątową oka do ocznej zatoki żyłnej. Badania przeprowadzono w okresie najdłuższych dni roku (18-24 czerwca). Próby krwi pobrano w dzień o godz.: 4, 8, 12, 16, 20 i w nocy o godz.: 22, 24; 2. Dodatkowo pobrano próby krwi obwodowej. We krwi odpływającej z oka oznaczono stężenie CO metodą chromatografii gazowej, po jego wyeluowaniu helem i przeprowadzeniu w metan w reaktorze metanizacji, w temp. 350°C. Stężenie hormonów oznaczano metodą RIA.

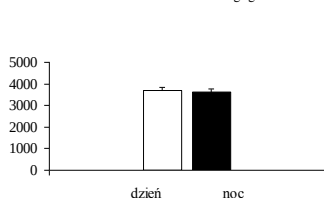
Wyniki:



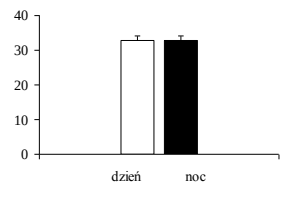
ryc. 1. Stężenie CO [ppm] w krwi odpływającej z oka w okresie długiego dnia świetlnego



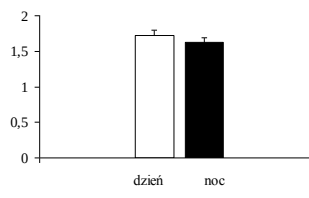
ryc. 2. Stężenie testosteronu [pg/ml] we krwi obwodowej podczas długiego dnia świetlnego



ryc. 3. Stężenie androstendionu [pg/ml] we krwi obwodowej podczas długiego dnia świetlnego



ryc. 4. Stężenie estradiolu [pg/ml] we krwi obwodowej podczas długiego dnia świetlnego



ryc. 5. Stężenie progesteronu [ng/ml] we krwi obwodowej podczas długiego dnia świetlnego

Wykazano że w dzień (godz. 4-20) z oczną krwią żyłą odpływa dwukrotnie większa ilość CO niż z okresie ciemności ($p \leq 0.005$). Stwierdzono istotnie niższe stężenie testosteronu we krwi obwodowej w nocy niż w dzień ($p \leq 0.005$). Stężenie innych hormonów steroidowych nie różniło się między dniem i nocą.

Badania finansowane w ramach projektu MNiSW nr N N311 1001 33

SESJA VIII

Biologiczne i środowiskowe uwarunkowania płodności człowieka i zwierząt

SESSION VIII

**Biological and environmental conditioning of fertility
in humans and animals**

ZWIĄZEK MIĘDZY CZYNNIKIEM GENETYCZNYM A ŚRODOWISKOWYM NIEPŁODNOŚCI MĘSKIEJ

POSSIBLE LINKS BETWEEN GENETIC AND ENVIRONMENTAL FACTORS IN MALE INFERTILITY

Marek Drożdżik¹, Joanna Stefankiewicz¹, Rafał Kurzawa²

¹Katedra Farmakologii, ²Klinika Rozrodczości i Ginekologii, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

W populacji ogólnej co najmniej 6% mężczyzn ma upośledzoną płodność, czego przejawem jest nieprawidłowy wynik badania nasienia (koncentracja, ruchliwość i morfologia plemników). Na jakość nasienia mogą wpływać różne czynniki środowiskowe, przede wszystkim zanieczyszczenia ksenobiotykami gleby, wody i powietrza. Największe zagrożenia stanowią substancje zaburzające gospodarkę hormonalną (*endocrine disruptors*), takie jak pestycydy, dioksyny i rozpuszczalniki organiczne. Do innych czynników zaliczamy nieodpowiednie warunki pracy (wysoka temperatura, promieniowanie, ekspozycja na szkodliwe substancje), leki, jak również przebyte zakażenia układu rozrodczego. Nie mniej istotny jest styl życia - dieta, nadużywanie alkoholu, palenie tytoniu i długotrwały stres. Wiadomo, że podatność osobnicza na działanie toksyn środowiskowych jest różna co może być warunkowane genetycznie.

Glikoproteina P, która jest produktem genu *MDR1* (*multidrug resistance 1*) może stanowić łącznik między czynnikiem środowiskowym i genetycznym niepłodności męskiej. Białko to uczestniczy w transporcie przez błonowy związków hydrofobowych usuwając je z komórek, tym samym zabezpieczając przed ich nadmierną akumulacją (np. toksyn, substancji kancerogennych). Glikoproteinę P stwierdza się w komórkach Leydiga, Sertolego, makrofagach oraz w luminalnej części komórek śródbłoka naczyń krwionośnych. Uczestniczy ona prawdopodobnie w ochronie komórek somatycznych przed działaniem ksenobiotyków, dodatkowo oddziałując na mikrośrodowisko kanalików krętych jądra regulując transport androgenów.

Ostatnio badaliśmy wpływ polimorfizmu czynnościowego 3435C>T (allel T – zmutowany jest związany z mniejszą aktywnością) genu *MDR1* u mężczyzn diagnozowanych z powodu niepłodności partnerskiej. Grupę kontrolną stanowili zdrowi i płodni mężczyźni. Genotypowanie przeprowadzono za pomocą metody PCR-RFLP. Przypadki niepłodności występowały znamienne częściej w grupie mężczyzn nosicieli co najmniej jednego allela zmutowanego T ($p < 0,05$ OR 1,84 95%CI: 1,10-3,07). Mimo, że polimorfizm 3435C>T genu *MDR1* wydaje się być dobrym predykatorem płodności męskiej, hipotezę i wstępne wyniki należy zweryfikować na większej grupie pacjentów oraz w innych populacjach.

MĘŻCZYŹNI Z KARIOTYPEM 46,XX

MEN WITH 46,XX KARYOTYPE

Jan Karol Wolski¹, Alicja Ilnicka², Barbara Pawłowska², Janusz G. Zimowski²,
Jolanta Bogdanowicz², Przemysław Kluge³, Katarzyna Kozioł¹, Piotr Lewandowski¹

¹ Przychodnia Leczenia Niepłodności „Novum”, 02-807 Warszawa, Bociania 13; jkwolski@op.pl

² Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii, 02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9

³ Zakład Patologii, Zakład Patologii, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
, 04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20

Wstęp: Wśród wymienianych przyczyn niepłodności męskiej, ocenia się, że zaburzenia genetyczne mają istotny wpływ u ok. 20% pacjentów. Kariotyp 46,XX występuje wśród mężczyzn z częstotliwością 0.005% (1/20.000 żywych urodzeń). Klinicznie zespół ten cechuje: fenotyp męski, prawidłowej długości prącie, małe jądra (hypogonadyzm) oraz azoospermia. Płeć psychiczna jest męska, a deklarowana orientacja - heteroseksualna. Istotą tej nieprawidłowości jest zachodząca w gonadzie męskiej podczas mejozy translokacja fragmentu krótkiego ramienia chromosomu Y na chromosom X lub rzadziej - na jeden z autosomów. Obecność w przemieszczonym fragmencie chromosomu Y (Yp) genu SRY (Sex-determining Region on the Y-chromosome), który koduje białko TDF (Testis Determining Factor), determinuje u płodu fenotyp męski. Ponieważ translokacja nie obejmuje długiego ramienia chromosomu Y (Yq) zawierającego region AZF (Azoospermia Factor), dlatego u nosicieli takiej rearanżacji stwierdza się brak plemników w nasieniu. Pomimo przyjętego standardu diagnostyki azoospermii, grupa mężczyzn 46,XX nie ma wskazań do wykonania biopsji gonad, ponieważ badania histologiczne tkanki jąder wykazują brak komórek szeregu spermatogenezy, włóknienie kanalików oraz przerost gruczołu śródmiaższowego.

Cel pracy: Celem pracy jest prezentacja kliniczna 4 pacjentów z hypogonadyzmem i azoospermia, u których stwierdzono kariotyp 46, XX.

Materiał i metody: Z grupy zgłaszających się do ośrodka leczenia niepłodności par, wyselekcjonowano mężczyzn z hypogonadyzmem w badaniu klinicznym i azoospermia, stwierdzoną, w co najmniej dwóch badaniach nasienia. W trakcie poszerzonej diagnostyki (wg wytycznych WHO i EAU), u każdego pacjenta określano w surowicy krwi poziomy hormonów (FSH, testosteron) oraz wykonywano USG gonad. W celu różnicowania z innymi zespołami klinicznymi z obecnością hypogonadyzmu i azoospermii oraz przed ustaleniem ostatecznych wskazań do biopsji jąder, pacjentów kierowano na badania cytogenetyczne. U mężczyzn, u których stwierdzono kariotyp 46,XX w rutynowym badaniu barwienia prążków techniką GTG, wykonano badania cytomolekularne z zastosowaniem techniki FISH (fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ) z paletą sond umożliwiających potwierdzenie obecności translokacji fragmentu chromosomu Y, zawierający gen SRY, na chromosom X. W celu określenia wielkości przemieszczonego fragmentu chromosomu Y przeprowadzono dodatkowo badania molekularne techniką PCR (Polymerase Chain Reaction), weryfikujące obecność genów SRY i amelogeniny oraz obszarów DYZ1 i DYZ3.

Wyniki: U czterech mężczyzn (ur. 1971, 1975, 1978, 1980) rutynowym badaniem z zastosowaniem techniki barwienia prążków GTG stwierdzono kariotyp 46,XX. W badaniu klinicznym tych pacjentów zwracały uwagę drobna, szczupła sylwetka ciała, prawidłowa wielkość prącia, skrajnie małe jądra ze średnią objętością ok. 3 mL (hypogonadyzm) oraz cechy znacznego niedoboru androgenów (skąpy zarost i owłosienie, delikatna skóra). Badania nasienia wykazywały azoospermie. U wszystkich określono profil hormonalny w surowicy krwi, stwierdzając podwyższone poziomy FSH, natomiast poziom testosteronu u 3 był w dolnych granicach, a u jednego pacjenta poniżej normy. W USG gonad uwidoczniło podwyższoną echogeniczność tkanki, świadczące o uszkodzeniu jąder. Wszyscy pacjenci mieli męską orientację psychoseksualną i pozostawali w heteroseksualnych związkach, nie raportując istotnych zaburzeń w zakresie libido, erekcji i ejakulacji.

U 3 z nich w badaniu techniką FISH potwierdzono obecność fragmentu krótkiego ramienia chromosomów Y (Yp) zawierającego gen SRY na krótkim ramieniu chromosomu X (Xp). U wszystkich pacjentów analiza molekularna z użyciem metody PCR potwierdziła obecność genu SRY

oraz wykazała brak fragmentu chromosomu Y zawierającego gen amelogeny i obszarów DYZ1 oraz DYZ3.

Wnioski: 1. Badanie kariotypu powinno być wykonane u każdego mężczyzny z hypogonadyzmem oraz z azoospermią przed planowaniem dalszej diagnostyki (biopsja jąder).

2. Diagnostyka genetyczna, obejmująca kariotyp oraz badania z zastosowaniem techniki FISH i PCR, umożliwia postawienie precyzyjnego rozpoznania klinicznego.

3. W związku ze spodziewanym obrazem histologicznym tkanki jąder (zdeteminowany genetycznie całkowity brak plemników), pomimo obowiązujących wytycznych EAU / WHO zalecających wykonywanie biopsji gonad w ramach diagnostyki pacjentów z azoospermią, mężczyźni 46,XX nie mają wskazań do tej procedury.

4. Mężczyźni z kariotypem 46,XX są wykluczeni z aktywnego udziału w rozrodzie. Proponowanym rozwiązaniem dla nieplodnej pary jest rozważenie użycia nasienia dawcy bądź adopcja.

5. W związku z niskim poziomem testosteronu mężczyźni 46,XX powinni mieć monitorowany poziom androgenów i są przewidziani do włączenia suplementacji hormonalnej w przyszłości.

1).De la Chapelle A, Hortling H, Niemi M, et al: "XX sex chromosomes in a human male: first case" *Acta Med Scand* 412, suppl.:25-38, 1964

2) "WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male" WHO, Cambridge University Press 2000

3) "European Association of Urology. Guidelines" 2007

4) Simoni M, Bakker E, Krausz C "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004", *International Journal of Andrology*, 27:240–249 (2004)

WPLYW SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH NA EKSPRESJĘ ENZYMÓW POCZĄTKOWEGO ETAPU STEROIDOGENEZY W GONADACH SAMCÓW

NUTRIENTS INFLUENCE ON EARLY STEP STEROIDOGENESIS ENZYMES EXPRESSION IN MALE GONAD

Jabłońska O.,¹ Benahmed M.² Gromadzka-Ostrowska J.¹

¹Warsaw University of Life Sciences, Faculty of Human Nutrition and Consumer Sciences, Department of Dietetics,
joanna.gromadzka-ostrowska@sggw.pl

²INSERM U407, Faculte de Medecine Lyon-Sud, Oullins Cedex, France

CEL PRACY

Ocena wpływu rodzaju tłuszczu pokarmowego oraz podwyższonego poziomu cholesterolu lub/i witaminy E na ekspresję enzymów wczesnego etapu steroidogenezy oraz białka StAR w gonadach.

MATERIAŁ I METODY

Trwające 3 tygodnie doświadczenie przeprowadzono na 102 dojrzałych płciowo samcach szczurów rasy Wistar. Zwierzęta otrzymywały wysokotłuszczowe (20% w/w) diety zawierające różne tłuszcze pokarmowe: grupa T – tran – bogaty w PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) n-3, grupa W – olej z pestek winogron – obfitujący w PUFA n-6, grupa R – olej rzepakowy – zawierającego głównie MUFA (*monounsaturated fatty acids*) i grupa Sm – smalec bogaty – w SFA (*saturated fatty acids*). Każdą z tych grup podzielono na 4 podgrupy: I – dieta bez dodatków, II – dieta + 3% (w/w) cholesterolu, III – dieta z dodatkiem witaminy E (500 mg/kg diety) i IV – dieta z oboma dodatkami. Szczury żywione granulatem hodowlanym Labofeed H (3% w/w tłuszczu) stanowiły grupę referencyjną (REF). Ekspresję genów enzymów steroidogenezy – desmolazy (P450scc) i 3 β -hydroksysteroidowej dehydrogenazy (3 β HSD) oraz genu białka StAR oznaczono techniką RT-PCR, a kodowane przez nie białka metodą Western blot. Stężenie LH i testosteronu w osoczu (To) oznaczano metodą RIA, stężenie testosteronu w gonadach (Tg) metodą EIA, a stężenie HDL metodą enzymatyczną.

WYNIKI

Badane czynniki żywieniowe istotnie wpłynęły na zmiany w ekspresji genów i białka enzymów wczesnych etapów steroidogenezy. W grupach T, R, Sm stwierdzono obniżenie ekspresji genu enzymu P450scc względem grup REF i W. Podobnie poziom kodowanego przez ten gen białka był niższy w grupach T, R, Sm vs. grupa W. W grupie R stwierdzono obniżenie poziomu mRNA genu białka StAR w porównaniu do wszystkich pozostałych grup, natomiast w grupie T – obniżenie ekspresji genu 3 β HSD w odniesieniu do grup W, R i Sm, bez istotnych zmian w poziomie białka tego enzymu. Suplementacja witaminą E (samą lub łącznie z cholesterolem) pokarmu grup W i R spowodowała obniżenie ekspresji genu białka StAR oraz obu enzymów, natomiast dodanie cholesterolu do pokarmu grupy T spowodowało wzrost ekspresji genu zarówno P450scc, jak i 3 β HSD. Stężenie To i Tg było istotnie wyższe w grupie Sm. Poziom HDL był znacznie niższy w wysokotłuszczowych grupach względem grupy REF, oraz wyższy w grupie Sm vs. grupa W. Zastosowanie dodatku witaminy E spowodowało obniżenie stężenia HDL w grupie R, natomiast jego wzrost w grupie Sm, odwrotnie w przypadku stężenia To i Tg.

WNIOSKI

Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że zarówno rodzaj tłuszczu, jak i dodanie do pokarmu witaminy E i/lub cholesterolu mogą istotnie wpłynąć na zaburzenie prawidłowych funkcji gonad.

ZABURZENIA W FUNKCJONOWANIU KOMÓREK ENDOMETRIUM I KOMÓREK UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO U NIEPŁODNYCH Kobiet z ENDOMETRIOZĄ

DISTURBANCES OF ENDOMETRIOTIC AND IMMUNOLOGICAL CELLS OF INFERTILE WOMEN WITH ENDOMETRIOSIS

Agnieszka Chrobak^{1,2}, Grzegorz Gmyrek², Urszula Sieradzka³, Marian Gabryś⁴, Małgorzata Jerzak⁵,
Hanna Zbyryt¹, Monika Szopa¹, Marian Goluda³, Rafał Sozański⁴, Marcin Jędryka³,
Anna Chelmońska-Soyta².

¹Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Tamka 2, 50-138 Wrocław; ²Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; Chrobak@iitd.pan.wroc.pl; ³Klinika Ginekologii, Położnictwa i Neonatologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Dąbrowskiego 5/7, 50-417 Wrocław; ⁴Klinika Ginekologii i Położnictwa Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 3, 50-368 Wrocław;

Endometrioza jest schorzeniem charakteryzującym się występowaniem śluzówki macicy poza jamą macicy. Występuje u około 10-15% kobiet w wieku rozrodczym i w około 30-40% par diagnozowanych z powodu niepłodności. Etiopatogeneza tego schorzenia jest wciąż niewyjaśniona. Nasze badania wykazały występowanie zaburzeń w funkcjonowaniu komórek endometrium oraz komórek układu immunologicznego w jamie macicy, w jamie otrzewnowej oraz w krwi obwodowej. Udowodniono zaburzenia w poziomie wydzielanych cytokin oraz w procesie apoptozy komórek endometrium w jamie macicy, jak również w jamie otrzewnowej. Udowodniono nieprawidłowości w poziomie cytokin Th1 i Th2 oraz cytokin proangiogennych w płynie otrzewnowym oraz w surowicy, jak również w poziomie syntezowanych cytokin przez limfocyty T, monocyty oraz makrofagi. Wykazano obniżoną proporcję limfocytów T pomocniczych do cytotoksycznych w jamie otrzewnowej oraz w krwi u kobiet z endometriozą. Zauważono obniżony poziom receptora estrogenowego alfa w limfocytach T krwi i płynu otrzewnowego oraz podwyższony poziom 17beta-estradolu w surowicy krwi w fazie proliferacyjnej cyklu menstruacyjnego. Wykazano zwiększoną spontaniczną i stymulowaną białkami macierzy proliferację limfocytów T krwi obwodowej kobiet z endometriozą. Zaburzenia występowały również w proporcjach populacji limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych ekspresjonujących antygeny zaangażowane w aktywację komórek, apoptozę i oddziaływanie z białkami macierzy.

Endometrioza jest schorzeniem o nieznanej etiopatogenezie, w której występują zaburzenia w funkcjonowaniu komórek endometrium o charakterze pierwotnym, natomiast nieprawidłowe zachowanie limfocytów T zarówno w płynie otrzewnowym, oraz w krwi obwodowej może mieć charakter wtórny.

WALPROINIAN SODU (VPA) HAMUJE ZALEŻNE OD GNRH UWALNIANIE LH Z KOMÓREK PRZEDNIEGO PŁATA PRZYSADKI SAMICY SZCZURA *IN VITRO*

VALPROATE (VPA) INHIBITS GNRH-INDUCED LH RELEASE FROM PRIMARY CULTURED FEMALE RAT ANTERIOR PITUITARY CELLS

Elżbieta Wasilewska-Dziubińska¹, Alina Gajewska², Ewa Wolińska-Witort¹,
Magdalena Chmielowska¹, Lidia Martyńska¹, Wojciech Bik¹, Anna Michaluk², Bogusława
Baranowska¹, Kazimierz Kochman²

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

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

Wstęp Walproinian sodu (VPA), lek przeciwpadaczkowy, może wywoływać szereg efektów ubocznych łącznie z zaburzeniami w układzie rozrodczym u mężczyzn i kobiet. Wykazano, że VPA może przyczynić się do powstawania zaburzeń w układzie rozrodczym u szczurów i szczurzyce bez padaczki. Długotrwałe podawanie VPA szczurzycom może wpływać na stężenie żeńskich hormonów płciowych w surowicy krwi i może wywołać torbielowatość jajników. Stwierdzono, że VPA wpływając na steroidogenezę hamuje konwersję testosteronu do estradiolu. w komórkach pęcherzykowych jajnika świni. Przedstawione wyniki sugerują możliwość bezpośredniego oddziaływania VPA na jajniki, chociaż nie można również wykluczyć pośredniego wpływu VPA poprzez wpływ na wydzielanie gonadotropin i dopiero wyniki doświadczeń przeprowadzonych na izolowanej tkance przysadki pozwolą wyjaśnić ten problem.

Cel pracy Celem podjętych badań była ocena wpływu VPA na podstawowe i stymulowane przez GnRH uwalnianie LH z komórek przedniego płata przysadki samicy szczura, *in vitro*.

Material i metody. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach hodowli pierwotnej komórek przedniego płata przysadki mózgowej pobranych od samic szczura rasy Wistar (220-250g). Po 3 godz. i po 24 godz. inkubacji w obecności 10^{-8} M VPA, 10^{-7} M VPA, 10^{-6} M VPA oraz po 3 godz. inkubacji w obecności 10^{-7} M GnRH, oraz 10^{-7} M GnRH i 10^{-6} M VPA łącznie, stężenie rLH w nadsączu oznaczano met.RIA.

Wyniki. Stwierdzono, że, VPA nie wywiera wpływu na podstawowe uwalnianie LH z komórek gonadotropowych przedniego płata przysadki samicy szczura *in vitro* podczas 3 i 24 godz. inkubacji, natomiast VPA hamuje indukowane przez GnRH wydzielanie LH z komórek gonadotropowych.

Wnioski. VPA może wpływać na układ reprodukcyjny samicy szczura poprzez modulację stymulowanego przez GnRH uwalniania LH bezpośrednio na poziomie przysadki.

Praca finansowana w ramach projektu CMKP nr 501-1-1-28-31/05

ROLA WYBRANYCH PEPTYDÓW PODWZGÓRZOWYCH I OBWODOWYCH W REGULACJI OSI GONADOTROPOWEJ, WPŁYW ŻYWIENIA

HYPOTHALAMIC AND PERIPHERAL PEPTIDE IN THE GONADOTROPHIC AXIS REGULATION OF THE REPRODUCTION: THE ROLE OF FEEDING

Anna Wójcik-Gładysz

*Zakład Endokrynologii, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt, Polska Akademia Nauk, ul Instytucka 3, 05-110, Jabłonna, a.
wojcik@ifzz.pan.pl*

Rezultaty badań prowadzonych w ostatnich latach wykazały, że większość hormonów biorących udział w regulacji homeostazy energetycznej wywiera jednocześnie istotny wpływ na procesy rozrodu zwierząt. Szczególnie dużo nowych informacji na temat zagadnienia, w jaki sposób informacje o stanie odżywienia organizmu i jego zasobach energetycznych przekazywane są do ośrodków regulujących funkcjonowanie układu rozrodczego przyniosły badania dotyczące problemu otyłości. Wiadomo bowiem, że dostępność pokarmu wywiera kluczowy wpływ na prawidłowy przebieg procesów rozrodu zwierząt. Zarówno krótkotrwały, jak i chroniczny niedobór pokarmu powodują zahamowanie aktywności sekrecyjnej hormonów układu gonadotropowego, co w konsekwencji prowadzi do zaburzeń rozrodu. Jednymi z najlepiej poznanych do tej pory związków, biorących udział w tym mechanizmie są neuropeptyd Y (NPY) i leptyna. Istnieją przesłanki, że również inne, niedawno odkryte hormony włączone w procesy utrzymania optymalnej równowagi energetycznej organizmu mogą być zaangażowane w regulację procesów rozrodu zwierząt, szczególnie w warunkach zaburzonego żywienia. Są to między innymi adiponektyny, hormony syntetyzowane głównie w tkance tłuszczowej, w adipocytach takie jak adiponektyna czy resystyna. Inne ważne hormony obwodowe uczestniczące w regulacji pobierania pokarmu to syntetyzowane w układzie pokarmowym: grelina, obestatyna oraz peptyd YY3-36. Biorąc pod uwagę fakt, że prawidłowe funkcjonowanie hormonów osi gonadotropowej jest uzależnione od stanu energetycznego organizmu, przypuszcza się, że związki te działając zarówno na obwodzie jak i na poziomie ośrodkowego układu nerwowego mogłyby, razem z leptyną i NPY, uczestniczyć w mechanizmie wiążącym status energetyczny organizmu z aktywnością układu GnRH-gonadotropiny.

Aktualnie dostępne dane sugerują, że szczególnie leptyna i grelina a możliwe że także inne hormony, mogą działać jako endokrynno-parakryne mediatory łączące homeostazę energetyczną i procesy rozrodcze. Ośrodkowy układ nerwowy, a szczególnie podwzgórze i przysadka, są głównymi miejscami działania tych nowych mediatorów apetytu, przez co mogą wpływać aktywność sekrecyjną GnRH jak również syntezę wydzielanie FSH i LH. Ponadto wykazano ekspresję m RNA dla leptyny, greliny i ich receptorów w różnych organach, tkankach związanych z reprodukcją takich jak: jajniki, jądra i łożysko. Wydaje się też, że hormony te biorą udział w różnych stanach rozwoju embrionalnego i implantacji. Celem tego wykładu jest podsumowanie działania „nowych regulatorów” homeostazy energetycznej i pokazanie ich wpływu na regulację rozrodu zwierząt.

S E S J A I X

Biologia rozrodu ptaków

S E S S I O N I X

Reproductive biology of birds

ROLA TRÓJJODOTYRONINY W REGULACJI SYNTEZY I SEKRECJI ESTROGENÓW W JAJNIKU KURY

ROLE OF TRIIODOTHYRONINE IN REGULATION OF ESTROGEN SYNTHESIS AND SECRETION IN CHICKEN OVARY

Andrzej Sechman¹, Katarzyna Pawłowska¹, Danuta Wrońska-Fortuna¹,
Ewa Ł. Gregoraszczyk², Janusz Rząsa¹

¹Katedra Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, E-mail: rzsechma@cyf-kr.edu.pl, ²Katedra Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków, E-mail: ewa.gregoraszczuk@uj.edu.pl

Cel pracy: Dotychczasowe dane literaturowe wskazują, że trójiodotyronina (T_3) włączona jest w regulację procesu steroidogenezy w jajniku ssaków [1] i ptaków [3]. Działanie tego hormonu zachodzi za pośrednictwem receptorów jądrowych, których ekspresję wykazano w zrębie (stromie) jajnika i we wszystkich jego strukturach [2]. Celem obecnych badań było określenie wpływu T_3 w warunkach *in vivo* i *in vitro* na syntezę i sekrecję estrogenów w jajniku kury.

Materiał i metody: Doświadczenia przeprowadzono na kurach Hy-Line Brown ($n=87$), które trzymano w cyklu świetlnym 14L:10D i żywiono *ad libitum*. W doświadczeniu *in vivo* (dośw. I) kury ($n=80$) podzielono na 4 grupy: kontrolną (0.9% NaCl) i trzy grupy otrzymujące przez 7 dni T_3 w dawkach 30, 90 lub 270 $\mu\text{g/kg}$ m.c./dzień. Iniekcje wykonywano dootrzewnowo dwa razy dziennie: rano o 8:00 ($\frac{1}{2}$ dawki) i wieczorem o 20:00 ($\frac{1}{2}$ dawki). Próbkę krwi pobierano przed podaniem hormonu oraz w 3, 5 i 7 dniu doświadczenia. Kury dekapitowano w ostatnim dniu doświadczenia, 12 h po ostatniej iniekcji hormonu. Z jajnika izolowano białe pęcherzyki (1-4, 4-6 i 6-8 mm) i pęcherzyki hierarchiczne (F6-F1; 8-36 mm). W doświadczeniu *in vitro* (dośw. II) kury ($n=7$) dekapitowano 22,5 h przed owulacją. Z jajnika pobierano stromę jajnika, pęcherzyki białe (1-4, 4-6 i 6-8 mm) oraz trzy największe pęcherzyki hierarchiczne (F3-F1; 25-36 mm), z których izolowano warstwę osłonki. Stromę, białe pęcherzyki i fragmenty osłonki inkubowano w medium Eagle'a przez 24 h w 6 następujących grupach: kontrolnej, T_3 (10 ng/ml), LH (10 ng/ml), oraz LH ze wzrastającymi dawkami T_3 (1, 10 i 100 ng/ml). Stężenie estradiolu (E_2) we krwi i pęcherzykach oraz E_2 i cAMP w medium inkubacyjnym oznaczano radioimmunologicznie. Ekspresję aromatazy (P450arom) w pęcherzykach - metodą RT-PCR.

Wyniki: Wykazano, że podawanie T_3 (dośw. I): (1) zmniejsza masę dużych (6-8 mm) białych i żółtych hierarchicznych pęcherzyków (F6-F1), (2) obniża stężenie E_2 we krwi oraz w ścianie białych pęcherzyków (1-8 mm) i żółtych pęcherzyków przedowulacyjnych (F3-F1), (4) nie wpływa na ekspresję mRNA P450arom we wszystkich badanych pęcherzykach. W warunkach *in vitro* (dośw. II) stwierdzono, że T_3 : (1) zmniejsza podstawowe i indukowane przez LH wydzielanie E_2 przez białe i przedowulacyjne pęcherzyki jajnikowe, (2) zwiększa produkcję cyklicznego AMP (cAMP) przez białe pęcherzyki, natomiast zmniejsza jego syntezę przez pęcherzyki F3 i F2, (3) hamuje stymulowaną przez LH syntezę cAMP we wszystkich badanych pęcherzykach.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują, że T_3 poprzez hamowanie podstawowej i stymulowanej przez LH syntezy estradiolu w pęcherzykach jajnikowych jest włączona w procesy zachodzące podczas ich wzrostu i dojrzewania. Działanie T_3 w warstwie osłonki pęcherzyka może być związane z modulacją wewnątrzkomórkowego szlaku sygnalizacyjnego cAMP/PKA.

Badania wykonano w ramach grantu 2 P06D 031 29 (2005-2008)

[1] Gregoraszczyk E.L., Skałka M., (1996). Reprod. Fertil. Dev. 8: 961-967.

[2] Sechman A., (2007). Acta Bioch. Pol. 54 (Suppl. 1/2007), p. 68.

[3] Sechman A., Mika M., Gregoraszczyk E.L., Rząsa J. (2006). XXXVI ESNA Meeting, Iasi, Romania, Abstracts, p. 36-37.

MAGAZYNOWANIE PLEMNIKÓW W JAJOWODZIE SAMIC A EFEKTYWNOŚĆ ROZRODU PTAKÓW DOMOWYCH

FEMALE SPERM STORAGE AND BREEDING EFFICIENCY IN THE DOMESTIC BIRDS

Małgorzata Gumułka, Ewa Kapkowska

*Katedra Hodowli Drobiu, Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny; Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
Al. A. Mickiewicza 24/28, 30 - 059 Kraków, mgkrak@poczta.onet.pl*

Jedną z charakterystycznych cech rozrodu ptaków jest zdolność samic do magazynowania plemników w jajowodzie, przy zachowaniu ich zdolności do zapłodnienia przez kilka dni u myszówka rdzawosternego (*buteo jamaicensis*) (Gee, 1983) do ponad stu u indyka domowego (*meleagris gallopavo domesticus*) (Christensen i Bagley, 1989).

Głównym miejscem magazynowania plemników są wyspecjalizowane struktury jajowodu określone jako kanaliki maciczo- pochwowe (Chelmońska i Kassner, 2007), kanaliki przechowujące nasienie (Rząsa, 2007) lub kanaliki przechowujące plemniki (KPP). Są one zlokalizowane w błonie śluzowej obszaru granicznego pomiędzy pochwą a gruczołem skorupowym. Plemniki obserwuje się na całej długości światła kanalików z większą koncentracją w ich ślepych końcu. Ich główki ułożone są równolegle względem siebie, z orientacją w kierunku komórek nabłonka kanalików (Bakst, 1992; King i wsp., 1999).

Z funkcjonalnego punktu widzenia światło kanalików stwarza wyspecjalizowane mikrośrodowisko dla zapewnienia przeżywalności plemników. Holm, (1999) uważa, że na jego kształtowanie wpływa między innymi poziom jonów wapniowych i cynkowych oraz enzym anhidraza węglanowa. Ich obecność wykazano w płynie otaczającym plemniki w kanalikach i/lub w komórkach nabłonka. Ponadto w cytoplazmie komórek nabłonka KPP kur domowych, indyczek i przepiórek japońskich wykazano obecność kropli lipidowych (Bakst, 1987; 1993). Uwalnianie z triacylogliceroli wolne kwasy tłuszczowe mogą dostarczać substratów niezbędnych do metabolizmu plemników dla zachowania ich ruchliwości w kanalikach (Froman, 2003). W błonie śluzowej jajowodu z obszaru połączenia między pochwą i gruczołem skorupowym stwierdzono niskocząsteczkowe (witamina E i C, GSH) oraz enzymatyczne (GSH-Px i SOD) antyoksydanty, które mogą zapobiegać peroksydacji lipidów plazmolemy magazynowanych plemników (Breque i wsp., 2006). Ponadto w błonie śluzowej tego rejonu jajowodu wykazano ekspresję mRNA izoformów i receptorów TGFβ, co sugeruje udział tego czynnika wzrostu w supresji immunoreakcji przeciw plemnikom (Das i wsp., 2006).

Przed zasiedleniem kanalików, plemniki podlegają procesowi selekcji w obszarze pochwy jajowodu (Steele i Wishart, 1992;1996). Tylko 1-2% spośród zawartych w dawce inseminacyjnej obserwuje się w KPP (Brillard i Bakst,1990). Ich uwalnianie, z kolei jest procesem ciągłym, niezależnym od cyklu owulacyjnego samicy (Wishart, 1987), przy czym wśród ptaków domowych wykazano różnice gatunkowe odnośnie jego tempa (Brillard, 1993).

Przedstawiona powyżej strategia rozrodcza ptaków eliminuje konieczność stałej obecności samca i codziennych, zsynchronizowanych z czasem owulacji, kopulacji w okresie znoszenia przez samice jaj. Jest ona w polu zainteresowania hodowców, gdyż dla praktyki drobiarskiej jej wymiernym efektem jest długość okresu znoszenia zapłodnionych jaj. Parametr płodności ważny zarówno przy stosowaniu naturalnego kojarzenia jaki i sztucznej inseminacji. Innymi z nieinwazyjnych, przyżyciowych metod umożliwiającymi poznanie efektywności magazynowania plemników przez ptaki domowe jest określanie liczby plemników „zatrzymanych” w warstwie pozajółtkowej zniesionych przez samice jaj oraz liczby otworów po ich penetracji (Bakst, 1998). W badaniach własnych (Gumułka i Kapkowska, 2005) wykazano obniżanie się wartości tych wskaźników wraz z wiekiem samic, co sugeruje jego oddziaływanie na funkcjonowanie KPP.

Wiedza dotycząca przechowywania plemników w jajowodzie ptaków jest interesująca zarówno z poznawczego punktu widzenia jak i w odniesieniu do rozrodu drobiu.

IZOLACJA, CHARAKTERYSTYKA I SEKWENCJONOWANIE CDNA AKROSINY INDORA (*MELEAGRIS GALLOPAVO*)

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND CDNA SEQUENCING OF A TURKEY (*MELEAGRIS GALLOPAVO*) ACROSIN

Mariola Słowińska¹, Mariusz Olczak², Ewa Liszewska¹, Mariola Wojtczak¹, Wiesław Wątopek², Andrzej Ciereszko¹

¹ Zakład Biologii Nasienia, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 747 Olsztyn
e-mail: marko@pan.olsztyn.pl

² Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

Akrosomy plemników ssaków charakteryzują się występowaniem licznych proteinaz serynowych. Najlepiej poznaną akrosomalną proteinazą serynową jest akrosyna (EC 3.4.21.10), która jest syntetyzowana w procesie spermatogenezy w formie nieaktywnego zymogenu proakrosyny. Pełen proces konwersji proakrosyny do akrosyny obejmuje powstanie kilku form przejściowych enzymu i prowadzi do utworzenia formy posiadającej aktywność enzymatyczną. W plemnikach ptaków stwierdzono obecność białek o aktywności proteolitycznej. Podstawowe cechy omawianej aktywności, w tym zdolność hydrolizy BAPNA, zasadowe optimum pH oraz hamowanie przez jony cynkowe sugerują obecność akrosyny. Jednakże brak jest bezpośredniego dowodu potwierdzającego tę hipotezę. Celem pracy była izolacja, charakterystyka i sekwencjonowanie cDNA akrosyny indora.

Nasienie uzyskano od indorów linii BUT Big - 6, metodą masażu grzbietowo-brzusznego. Plazmę nasienia oddzielono przez wirowanie (12 800 x g). Do przemytych plemników (0,88% NaCl) dodawano 4 M mocznik i zawiesinę plemników 2-krotnie zamrażano w ciekłym azocie. Następnie próby poddawano sonikacji. Ekstrakt z plemników poddawano chromatografii jonowymiennej na kolumnie X/K wypełnionej anionitem Q Sepharose™ High Performance (Amersham Biosciences). Złoże równoważono 20mM buforem Tris-HCl (pH 7,6) zawierającym 6M mocznik. Białka wymywano przy użyciu gradientu NaCl (0,0 – 0,25M NaCl). Aktywność amidazową określano na podstawie hydrolizy BAPNA. Proteinazy identyfikowano przy pomocy SDS-PAGE - żelatyna. Masę cząsteczkową szacowano przy pomocy filtracji żelowej oraz elektroforezy SDS-PAGE - żelatyna. Deglikozylację przeprowadzono przy użyciu rekombinowanej N-glikozydazy F. Oczyszczone białko poddano transferowi na błonę PVDF i poddano sekwencjonowaniu od N-końca (BioCentrum, Kraków). Na podstawie określonej sekwencji zaprojektowano startery i uzyskano cDNA, które poddano sekwencjonowaniu. Aktywację systemu proteolitycznego plemników przeprowadzono poprzez inkubację prób w 0,3 M buforze Tris-HCl w temperaturze 37°C.

W plemnikach indora stwierdzono występowanie systemu proenzym/enzym, podobnego do systemu proakrosyna/akrosyna ssaków. W wyniku aktywacji proteinaz plemników indora z prekursorów o wyższych masach cząsteczkowych uzyskano proteinazę o masie 33 kDa. Omawiana aktywacja hamowana była przez inhibitory proteinaz serynowych. Chromatografia jonowymienna w obecności 6 M mocznika, umożliwiła uzyskanie czystych preparatów głównej proteinazy serynowej plemników indora. Masę cząsteczkową oszacowano na 26,3-33,0 kDa, pI na 6,50-5,76. Nie stwierdzono wyraźnej deglikozylacji proteinazy. Stała Michaelisa wynosiła $0,9 \times 10^{-3}$ M. Określono następującą N-końcową sekwencję aminokwasową VVGGTEALHGSWPWIVSIQNPRFAGT wykazującą wysoki stopień homologii do łańcucha ciężkiego akrosyny ssaków. Na podstawie omawianej sekwencji uzyskano cDNA proakrosyny. Otrzymaną sekwencję umieszczono w bazie danych EMBL pod numerem dostępu AM167974. Uzyskane wyniki wskazują na obecność w plemnikach indora proakrosyny składającej się z 346 aminokwasów. Najbardziej prawdopodobne miejsce odcięcia peptydu sygnałowego wyznaczono pomiędzy 19 a 20 aminokwasem. Łańcuch lekki akrosyny indora składa się z 21 aminokwasów, ciężki z 306 aminokwasów. Analiza uzyskanej sekwencji aminokwasowej wskazała na możliwość zajęcia potranslacyjnych modyfikacji enzymu (N i O-glikozylacja).

Praca wykonana w ramach grantu N N311 1121 33

WPLYW ODCHOWU INDYWIDUALNEGO ORAZ GRUPOWEGO NA FORMY WIELOPOSTACIOWE β -N-ACETYLOGLUKOZAMINIDAZY Z JĄDER SAMCÓW PRZEPÍÓRKI JAPÓŃSKIEJ

EFFECT OF INDIVIDUAL VERSUS GROUP CAGING ON THE β -N ACETYLGLUCOSAMINIDASE MULTIPLE FORMS IN MALE JAPANESE QUAIL TESTES

Bogusław Droba¹, Maria Droba¹, Radosław Józefczyk¹, Andrzej Witkowski²

¹ Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, Ćwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów, mdroba@univ.rzeszow.pl

² Uniwersytet Przyrodniczy, Wydział biologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Akademicka 13, 20-950 Lublin, andrzej.witkowski@ar.lublin.pl

β -N-Acetyloglukozaminidaza (β -HEX, EC 3.2.1.30) jest glikozydazą często o najwyższej aktywności w męskim układzie rozrodczym ssaków i ptaków, mogącą pełnić tam szereg istotnych funkcji. Na rozwój postnatalny męskiego układu rozrodczego i jego funkcjonowanie znaczny wpływ wywiera stres (social stress) i hormony stresu.

Celem pracy było podjęcie próby wyjaśnienia przyczyn występowania różnic między dorosłymi osobnikami przepiórki japońskiej dotyczących charakterystyki form wielopostaciowych β -HEX jąder samców.

Przepiórki od momentu wylęgu były utrzymywane razem (samce i samice) do 10 dnia życia; następnie część ptaków wybranych losowo została umieszczona w osobnych klatkach. Poza tym wszystkie osobniki były utrzymywane w tych samych warunkach. Badano jądra przepiórek: a) w rozwoju postnatalnym trzymany razem do 10 dnia życia, b) utrzymywanych razem od 10 do 31 dnia życia, c) utrzymywanych osobno od 10 do 31 dnia życia. Pobrane od samców jądra homogenizowano, odwirowywano a supernatant zawierający aktywność β -HEX наносono na kolumnę wypełnioną anionitem (Macro-Prep High Q), zrównoważoną buforem histydyna-HCl, 25 mM, pH 6.0. Białko związane z kolumną eluowano gradientem NaCl. W zebranych frakcjach oznaczano aktywność β -HEX wg Barretta i Heatha, 1977 (Lysosomes: a laboratory handbook). Na drodze rozdziału chromatograficznego aktywność β -HEX ulegała rozdzielaniu na dwie główne formy: formę I nie ulegającą związaniu na kolumnie i formę II eluowaną z kolumny gradientem NaCl. We frakcjach zebranych po kolumnie oznaczano aktywność β -HEX i określano procentowy udział formy I i II w profilu elucyjnym.

Stwierdzono, że dla wszystkich osobników utrzymywanych razem do 10 dnia życia stosunek całkowitych aktywności formy I do formy II wynosi około 1. Dla osobników powyżej 10 dnia życia utrzymywanych razem stosunek formy I/II wynosi od 1 do 1.5, a dla osobników utrzymywanych osobno wynosi od 2.5 do 5.0. Zarejestrowano również nieliczne przypadki (dwa) kiedy osobniki utrzymywane razem wykazywały podwyższone wartości stosunku formy I/II (około 5), oraz przypadki obniżenia wartości tego stosunku poniżej 2.5 dla osobników utrzymywanych osobno.

W tej pracy po raz pierwszy donosimy o wpływie sposobu odchowu ptaków na aktywności form wielopostaciowych β -HEX z jąder przepiórki japońskiej.

WPLYW PROCESU KRIOKONSERWACJI NA PEROKSYDACJĘ LIPIDÓW BŁON KOMÓRKOWYCH PLEMNIKÓW KOGUTA

EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON LIPID PEROXIDATION OF ROOSTER SPERM MEMBRANE

Agnieszka Partyka

Zakład Hodowli Drobiu, Instytut Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, partykaagnieszka@gmail.com

Wysoka zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w plemnikach ptaków zwiększa ich podatność na peroksydację lipidów, co stanowi problem podczas przechowywania nasienia. Uszkodzenia peroksydacyjne powodują powstawanie wad morfologicznych oraz redukcję ruchliwości plemników. Z tego powodu, utlenianie lipidów jest uważane za jedną z głównych przyczyn utraty zdolności zapładniającej podczas przechowywania nasienia ptaków.

Niniejsze badania miały na celu określenie wpływu procesu kriokonserwacji nasienia kogutów na peroksydację lipidów błon komórkowych plemników.

Materiał doświadczalny stanowiło nasienie 8 kogutów Zielononóżki kuropatwianej (typ ogólnoużytkowy) oraz 8 osobników linii mięsnej Flex, pobierane 13. krotnie, metodą masażu grzbietowo-brzusznego. Analizę przeprowadzono na nasieniu świeżym oraz zamrożonym/rozmrożonym. Nasienie poddano procesowi kriokonserwacji metodą „kulkową”, rozcieńczając je rozrzedzalnikiem EK i stosując 6% DMA (dimetyloacetamid), jako środek kriochronny. Próbkę rozmrażano przez 2-3 sek. w temperaturze 60°C. Plemniki barwiono przez 30 min. w temp. 37°C, stosując C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid; Molecular Probes) w stężeniu końcowym 2nM. Barwnik ten wiąże się do błon komórkowych i wywołuje czerwoną fluorescencję w komórkach bez peroksydacji lipidów, natomiast w momencie, gdy proces ten zachodzi, świecenie komórek zmienia się na zielone. W celu wyodrębnienia populacji plemników martwych, komórki jednocześnie barwiono jodkiem propidyny (PI). Próbkę poddano analizie w cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Proces kriokonserwacji nasienia badanej rasy i linii kogutów spowodował istotną ($P \leq 0,01$) zmianę w proporcjach następujących subpopulacji komórek: plemniki martwe bez peroksydacji lipidów błon komórkowych; plemniki martwe z peroksydacją lipidów; plemniki żywe bez peroksydacji lipidów oraz plemniki żywe z peroksydacją lipidów. Procedura zamrażania/rozmrażania nasienia w istotny ($P \leq 0,01$) sposób wpłynęła na zwiększenie utleniania błon komórkowych, zarówno w gametach żywych jak i martwych. Ponadto wykazano istotne ($P \leq 0,01$) różnice między badaną rasą i linią pod względem udziału poszczególnych subpopulacji plemników w nasieniu świeżym oraz zamrożonym/rozmrożonym. Nasienie kogutów linii Flex charakteryzowało się istotnie ($P \leq 0,01$) wyższym, w porównaniu do nasienia Zielononóżki kuropatwianej, odsetkiem plemników, u których stwierdzono proces utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych błon komórkowych.

Uzyskane wyniki wskazują, że kriokonserwacja nasienia kogutów zwiększa podatność plemników na stres oksydacyjny, co wyraża się zwiększonym nasileniem procesu peroksydacji lipidów błon komórkowych gamet. Jednocześnie, zaobserwowane różnice w jakości nasienia kogutów analizowanych typów użytkowych, potwierdzają zróżnicowaną zdolność ich plemników do przeżywania procedury zamrażania/rozmrażania.

WPLYW KWASU ASKORBINOWEGO NA ROZWÓJ ZARODKA KURZEGO- WSTĘPNE BADANIA

INFLUENCE OF ASCORBIC ACID ON CHICKEN EMBRYO DEVELOPMENT -PRELIMINARY STUDY

Lis M.W.¹, Sechman A.², Przybyło A.¹, Niedziółka AE.¹, Niedziółka J.W.¹

¹Katedra Hodowli Drobiu, Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny email: rzlis@cyf-kr.edu.pl, ²Katedra Fizjologii Zwierząt, e-mail: rzsechma@cyf-kr.edu.pl, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Cel pracy: Udział kwasu askorbinowego (*ang. ascorbic acid*, AA) w embriogenezie ptaków nie jest w pełni wyjaśniony. Związek ten nie występuje w jajku kury (*Gallus gallus domesticus*), a jego synteza rozpoczyna się dopiero ok. 6 doby inkubacji (E6) w woreczku żółtkowym, wątrobie i nerkach, skąd jest on transportowany do innych tkanek. Dlatego interesującym wydawało się zbadanie, czy podanie AA *in ovo* wpłynie na dalszy przebieg embriogenezy i wyniki lęgu.

Materiał i metody: Przeprowadzono dwa doświadczenia, w których wykorzystano jaja wylęgowe kur linii mięsnych Ross 308 o masie 62 ± 5 g. Inkubację przeprowadzano w inkubatorze halowym typu Petersime S576 (T - 37,8°C i RH 50%) i klujniku typu Petersime H 192. W doświadczeniu 1 (dwa powtórzenia, n= 150 jaj/grupę) iniekcję AA *in ovo* w dawce 0, 2,5; 5,0 lub 10,0 mg/jajo (AA rozpuszczono w 0,7% NaCl) przeprowadzano w 6 dobie inkubacji (E6). W doświadczeniu 2 (jedno powtórzenie) iniekcję *in ovo* AA w dawce 0 lub 2,5 mg/jajo przeprowadzano w E0, E6, E12 i E17 (n=150 jaj/grupę). Iniekcje wykonywano do białka jaja pod błonę omocznioowo-kosmówkową. Po wylęgu oceniano jakość piskląt i ich masę ciała. Zarodki z jaj niewyklutych poddano analizie embriopatologicznej. Oceniano ogólny rozwój zarodka, stopień retrakcji woreczka żółtkowego oraz występowanie anomalii rozwojowych.

Wyniki: Stwierdzono ujemną korelację pomiędzy wynikami lęgu a dawką AA oraz dniem iniekcji. Obserwowano, że zarodki zamierały przede wszystkim w okresie ok. 2 dni po przeprowadzonej manipulacji. Pogorszenia wyników lęgów nie stwierdzono jedynie w grupie otrzymującej AA w E17 ($P>0.05$). Podanie AA w E6 skutkowało upośledzeniem rozwoju (karłowatością) oraz poważnymi deformacjami rozwojowymi zarodka. Częstotliwość występowania tych zmian wzrastała wraz z dawką AA. Do najbardziej charakterystycznych deformacji należały: niedorozwój lub brak kończyn, upośledzenie rozwoju układu powłokowego, co sprawiało, że narządy wewnętrzne rozwijały się na zewnątrz jamy ciała, upośledzenie rozwoju kości trzewioczaski (przepuklina mózgowa) i twarzoczaski oraz zrośnięcie woreczka żółtkowego z mózgowiem. Pomimo tak dużych zniekształceń, większość potworkowatych zarodków charakteryzowała się dużą żywotnością i zamierała dopiero w E19-E20 lub wymagała eutanazji podczas analizy embriopatologicznej odpadu powylęgowego.

Wnioski: Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że kwas askorbinowy jest substancją wpływającą na przebieg embriogenezy u ptaków. Podawanie AA w początkowej fazie embriogenezy prowadzi do poważnych zmian embriopatologicznych. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych wnikliwych badań.

Badania wykonano w ramach Projektu Badawczego MNiSW N N311 1351 33

METODY DIAGNOZOWANIA ZDOLNOŚCI REPRODUKCYJNEJ PTAKÓW

EVALUATION METHODS OF AVIAN REPROUDCTIVE ABILITY

Ewa Łukaszewicz, Agnieszka Partyka

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Zakład Hodowli Drobi, Wrocław; ewa.lukaszewicz@up.wroc.pl

Zdolność do rozmnażania i wydawania potomstwa jest jedną z podstawowych cech każdego żywego organizmu. U ptaków wolno żyjących właściwość ta jest ściśle uzależniona od warunków środowiskowych, u ptaków hodowlanych podobnie – od zapewnienia im właściwych warunków mikroklimatycznych i żywienia. Celem hodowcy jest uzyskanie jak największej liczby potomstwa do dalszej reprodukcji lub produkcji komercyjnej, a to z kolei zależy od odpowiedniego doboru osobników do rozrodu.

W praktyce najczęściej stosowanym kryterium płodności ptaków domowych jest procent zapłodnionych jaj i liczba piskląt uzyskanych od jednej samicy. Jednakże w zależności od gatunku określenie tego wskaźnika możliwe jest dopiero po 8-42 dniach od zapłodnienia, a ponadto nie zawsze pozwala to na stwierdzenie liczby zarodków zamarłych we wczesnych stadiach rozwoju.

W świeżo zniesionych jajach, na podstawie makroskopowej oceny tarczki zarodkowej można określić poziom zapłodnienia jaj, a po odpowiedniej preparacji błony witelinowej można także obliczyć liczbę otworów pozostawionych przez plemniki penetrujące błonę okołozółtkową lub liczbę plemników uwieczonych pomiędzy błonami witelinowymi, co pozwala na szacunkową ocenę długości okresu płodności samicy. Niestety procedury te łączą się z koniecznością rozbicia jaja i utratą potencjalnego pisklęcia.

Ponieważ poziom zapłodnienia jaj w znacznym stopniu zależy od jakości nasienia, stąd też najwięcej jest metod oceny zdolności reprodukcyjnej samców na podstawie oceny jakości jego nasienia, począwszy od prostych metod makroskopowych, do technik wymagających użycia specjalistycznej i niejednokrotnie drogiej aparatury. Wczesna ocena samca-reproduktora na podstawie jakości jego nasienia jest szczególnie ważna w przypadku ferm zarodowych w których podejmowane są decyzje o wyborze samców do rozrodu oraz przy stosowaniu sztucznej inseminacji. Najprostszymi i podstawowymi cechami ocenianymi w nasieniu to: barwa, konsystencja, stopień zanieczyszczenia, objętość, koncentracja i ruchliwość plemników oraz ich obraz morfologiczny, w tym udział plemników żywych o prawidłowej budowie morfologicznej, martwych i zdeformowanych. Cechy te można określić mając do dyspozycji płytę grzewczą i mikroskop z obiektywem immersyjnym.

Wraz z rozwojem nauki i zagłębianiem się w jej nowe dziedziny następuje również rozwój nowych i coraz bardziej skomplikowanych technik badawczych. Konwencjonalna ocena nasienia z zastosowaniem mikroskopu świetlnego coraz częściej zastępowana jest przez techniki fluorescencyjnego barwienia, cytometrię przepływową oraz analizatory nasienia wspomagane komputerowo (CASA).

Cytometria przepływowa, w której wykorzystuje się barwniki fluorescencyjne pozwala na ocenę strukturalnych i funkcjonalnych właściwości pojedynczych komórek. Stosując takie odczynniki jak SYBR-14, jodek propidyny, rodamina 123, lektyny lub oranż akrydyny możliwe jest określenie żywotności plemników, stopnia integralności błon komórkowych, aktywności mitochondrialnej czy struktury akrosomów oraz DNA. Zaletami tej metody jest szybkość odczytu, dokładność, obiektywizm otrzymanych wyników oraz możliwość oceny pewnych właściwości równocześnie, barwiąc komórki kilkoma barwnikami.

Z kolei system CASA umożliwia dokładną i szybką analizę torów ruchu poszczególnych plemników, obliczając jednocześnie odsetek plemników ruchliwych, odsetek plemników o ruchu postępowym oraz opisując wiele właściwości związanych z szybkością i liniowością ruchu plemników.

S E S J A X

Neuro-endokrynnna regulacja funkcji jajnika i cyklu płciowego

S E S S I O N X

**Neuroendocrine regulation of ovary function
and reproductive cycle**

STĘŻENIE WYBRANYCH ANTYOKSYDANTÓW W PŁYNIE PĘCHERZYKOWYM ORAZ WPŁYW SELENU NA DOJRZEWANIE OOCYTÓW ŚWINI *IN VITRO*

CONCENTRATION OF SELECTED ANTIOXIDANTS IN FOLLICULAR FLUID AND EFFECTS OF SELENIUM ON *IN VITRO* MATURATION OF PIG OOCYTES

Tomasz Stankiewicz, Barbara Błaszczyk, Jan Udała, Dariusz Gączarzewicz

Katedra Rozrodu Zwierząt, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza w Szczecinie

E-mail: tomasz.stankiewicz@biot.ar.szczecin.pl

W pracy określono stężenie witaminy E i selenu (Se) w płynie pęcherzyków jajnikowych świnii z uwzględnieniem wielkości pęcherzyka oraz podjęto próbę określenia wpływu dodatku selenu na dojrzewanie oocytów *in vitro* (IVM).

Badania wykonano na jajnikach loszek pozyskanych poubojowo. Płyn aspirowano z pęcherzyków: owulacyjnych (średnica od 10 do 12 mm; n=20), średnich (średnica od 7 do 9 mm (n=20) i z 210 pęcherzyków małych (średnica poniżej 6 mm). W przypadku tych ostatnich, aby uzyskać odpowiednią do analiz objętość próby, płyn pozyskiwano z 10 pęcherzyków z tego samego jajnika i włączano do wspólnej puli (n=21). Stężenie witaminy E określono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), natomiast koncentrację selenu oznaczono fluorometrycznie. Po określeniu pęcherzykowego stężenia selenu podjęto próbę modyfikacji medium do dojrzewania oocytów (NCSU-23) wzbogacając je o różne dawki selenu: 0,11 µg/ml (oocyty I; n=81), 0,5 µg/ml (oocyty II; n=83), 1,0 µg/ml (oocyty III; n=79). Grupę kontrolną stanowiły oocyty poddane dojrzewaniu w medium bez dodatku selenu (K; n=80). Procedura pozaustrojowego dojrzewania została przeprowadzona według metody Abeydeera i Daya (1997). Jakość oocytów oceniano na podstawie stopnia rozproszenia komórek wzgórk jajonośnego oraz obecności lub braku pęcherzyka zarodkowego (stadium GV lub GVBD). Ponadto, oceniano żywotność oocytów wykorzystując barwienie błękitem trypanu.

Stężenie witaminy E w pęcherzykach owulacyjnych, średnich i małych wynosiło odpowiednio $2,97 \pm 0,92$; $0,46 \pm 0,21$ i $0,81 \pm 0,25$ µg/ml. W stężeniu wit. E stwierdzono istotne różnice między pęcherzykami owulacyjnymi a średnimi ($P \leq 0,05$) i małymi ($P \leq 0,01$). Odwrotnie natomiast kształtowały się różnice w stężeniu selenu. Koncentracja Se w pęcherzykach małych wynosiła $0,11 \pm 0,02$ µg/ml i była istotnie wyższa niż w średnich i owulacyjnych ($P \leq 0,01$). W wyniku przeprowadzonej procedury IVM największy odsetek dojrzałych oocytów (54,32%) uzyskano w pożywce wzbogaconej selenem o stężeniu 0,11 µg/ml. Niemniej jednak nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy tą grupą oocytów a oocytami z grupy II, III i K. Zanotowano natomiast istotnie niższy odsetek dojrzałych oocytów (24,05%) hodowanych w medium zawierającym selen w stężeniu 1,0 µg/ml w porównaniu do oocytów hodowanych w medium o niższej koncentracji selenu ($P \leq 0,01$).

Uzyskane wyniki wskazują, iż stężenie witaminy E i selenu zależą od wielkości pęcherzyka i sugerują jednocześnie na udział tych antyoksydantów w rozwoju pęcherzyka jajnikowego świnii. Podjęte w pracy wstępne próby modyfikacji medium do dojrzewania oocytów poprzez dodanie do niego selenu wskazują, że odpowiednie dawki tego pierwiastka mogą poprawić efektywność pozaustrojowego dojrzewania oocytów świń, sugerując jednocześnie potrzebę prowadzenia dalszych prac w tym kierunku.

WPLYW FITOESTROGENÓW NA SEKRECJĘ I SYNTEZĘ OKSYTOCYNY Z KOMÓREK LUTEALNYCH I KOMÓREK WARSTWY ZIARNISTEJ KROWY

THE INFLUENCE OF PHYTOESTROGENS ON SECRETION AND SYNTHESIS OF OXYTOCIN (OT) IN LUTEAL AND GRANULOSA CELLS OF COW

Jarosław Młynarczuk, Michał Wróbel, Jan Kotwica

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, ul. Tuwima 10, 10-740 Olsztyn,
e-mail: jarecki@pan.olsztyn.pl*

Fitoestrogeny, naśladujące działanie estradiolu, występują w takich roślinach jak np. soja, koniczyzna czy lucerna. Z tego względu substancje te mogą wpływać na procesy rozrodcze ludzi i zwierząt, w tym bydła, działając na różnych poziomach regulacyjnych cyklu płciowego. Oksytocyna (OT) jajnikowa uczestniczy w regulacji prawie każdego etapu cyklu płciowego krowy. Wpływ ten obejmuje wzrost pęcherzyków jajnikowych, ich dojrzewanie i owulację a następnie formowanie ciała żółtego i regulację czasu jego trwania. Stąd wszelkie zakłócenia w syntezie i sekrecji OT mogą niekorzystnie wpływać na prawidłowy przebieg całego cyklu płciowego i być jedną z przyczyn spadku płodności oraz zwiększonej zamieralności zarodków. Dlatego celem badań było określenie wpływu fitoestrogenów na proces syntezy i sekrecji OT w komórkach lutealnych i warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego krowy.

Do badań użyto komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego z pęcherzyków o średnicy < 1 i > 1 cm, uzyskane przez przepłukiwanie ich własnym płynem oraz komórki lutealne z 5-15 dnia cyklu, uzyskane drogą perfuzji enzymatycznej. Komórki ($2.5 \times 10^5/\text{ml}$), po 24 godz. preinkubacji, inkubowano z daidzeiną, genisteiną lub kumestrolom w dawkach (1×10^{-6} i 1×10^{-7} M) przez 72 (w celu oceny zmian w sekrecji OT) lub 8 godz. (1×10^{-6} M) w celu określenia ekspresji dwóch genów uczestniczących w syntezie OT; tj. genu odpowiedzialnego za syntezę kompleksu neurofizyna-I/OT (NP-I/OT), który jest prekursorem OT oraz genu monooksygenazy peptydyloglicylo- α -amidowej (PGA) – enzymu uczestniczącego w przemianach potranslacyjnych prekursora OT. Stężenie OT w medium oceniano metodą EIA, natomiast ekspresję genów badano przy użyciu półilościowej metody RT-PCR, wobec genu referencyjnego G3PDH.

Fitoestrogeny w obu dawkach, zwiększały ($P < 0.05$) sekrecję OT z komórek granulozy z pęcherzyków obu wielkości. Natomiast w dawce 10^{-6} M zwiększały one sekrecję OT ($P < 0.05$) z komórek lutealnych z 5-10 dnia cyklu, zaś w dawce 10^{-7} M nie obserwowano ($P > 0.05$) tego efektu w przypadku kumestrolu, a wpływ daidzeiny był niższy ($P < 0.05$) niż w przypadku dawki wyższej. W hodowlach komórek lutealnych z 11-15 dnia cyklu wszystkie fitoestrogeny stymulowały sekrecję OT w dawce 10^{-6} M. Zaś w dawce 10^{-7} M jedynie genisteina nie stymulowała ($P > 0.05$) uwalniania OT. Wszystkie użyte fitoestrogeny zwiększały ekspresję genu PGA ($P < 0.05$) w komórkach granulozy. Natomiast kumestrol nie wpływał ($P > 0.05$) na ekspresję genu NP-I/OT. Użyte fitoestrogeny zwiększały ekspresję zarówno genu PGA jak i NP-I/OT w komórkach lutealnych, za wyjątkiem wpływu daidzeiny na ekspresję genu NP-I/OT.

Badane fitoestrogeny stymulują sekrecję OT z komórek warstwy ziarnistej i komórek lutealnych krowy. Wpływają one także na syntezę OT dwoma drogami: poprzez zwiększenie ilości prekursora OT oraz zwiększanie ilości enzymu (PGA) odpowiedzialnego za przemiany potranslacyjne prekursora OT. Zmiany te mogą istotnie zakłócać przebieg cyklu rujowego i być może, również upośledzać proces implantacji blastocysty.

STĘŻENIE PROGESTERONU, OKSYTOCYNY I NORADRENALINY ORAZ ICH RECEPTORÓW W CIAŁKU ŻÓŁTYM PODCZAS CYKLU RUJOWEGO KROWY

CONCENTRATIONS OF PROGESTERONE, OXYTOCIN AND NORADRENALINE AND THEIR RECEPTORS IN CORPUS LUTEUM DURING ESTROUS CYCLE IN COW

Robert Rękawiecki, Anna Nowocin, Jan Kotwica

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie,
ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn, e-mail: robert@pan.olsztyn.pl*

Progesteron wytwarzany w ciałku żółtym (CL) poprzez swoje wielokierunkowe działanie powoduje wytworzenie odpowiednich warunków dla implantacji zarodka, jego rozwoju, oraz zapewnia prawidłowy przebieg ciąży. Synteza P_4 jest złożonym procesem podlegającym regulacji przez czynniki dostarczane do jajnika z krwią lub syntezowane lokalnie w CL. Do tych ostatnich należą m.in. oksytocyna (OT) i noradrenalina (NA), które po związaniu odpowiednio do receptora oksytocyny (OT-R) i β_2 -adrenergicznego (β_2 -R) w CL wpływają na drodze autokrynowo-parakrynowej na jego funkcję wydzielniczą.

Celem tej pracy było zbadanie zmian stężeń hormonów (OT, NA i P_4), ekspresji genów i poziomu białek receptorów (OT-R i β_2 -R) jak również korelacji między poziomami ekspresji genu i poziomami białek OT-R, β_2 -R w stosunku do hormonu przyłączanego do danego receptora, a także korelacji stężeń P_4 z NA i OT w cyklu rujowym krowy.

Materiał badawczy stanowiły ciała żółte z 1-5, 6-10, 11-16 i 17-21 dnia cyklu rujowego (n=4/faza cyklu) pozyskane od zwierząt w 20 min. po uboju przemysłowym. Z części każdego CL wyizolowano całkowity RNA który poddano odwrotnej transkrypcji, a następnie metodą reakcji PCR oznaczono poziom ekspresji genów dla OT-R, β_2 -R względem genu referencyjnego GAPDH (dehydrogenaza 3-fosfo gliceraldehydowa). Pozostałą część każdego CL poddano lizie. W uzyskanym lizacie, metodą western blot, oznaczono poziom białka dla OT-R, β_2 -R względem poziomu białka GAPDH. Stężenie hormonów oznaczono metodą EIA.

Najwyższy poziom ekspresji genu OT-R występował w 1-5 i 17-21 dniu cyklu zaś najniższy w 6-10 i 11-16 dniu cyklu rujowego. Przeciwnie do poziomu ekspresji genu kształtował się ilości białka OT-R i OT. Najniższą ekspresję genu β_2 -R wykazano w 1-5 dniu cyklu, która następnie wzrastała w 6-10 dniu cyklu, utrzymując się na stałym poziomie do końca cyklu. Najwyższy poziom białka β_2 -R stwierdzono w 1-5 dniu cyklu. Po czym jego ilość ciągle obniżała się i osiągając najniższy poziom w 17-21 dniu cyklu. Stężenie NA w CL malało od 1-5 do 11-16 dnia a następnie wzrastało w 17-21 dniu cyklu. Poziom białka OT-R jak i β_2 -R w CL był dodatnio skorelowany z zawartością OT ($r = 0.90$) ($P < 0.0001$) i NA ($r = 0.73$) ($P < 0.01$) w tkance lutealnej. Stężenie P_4 było skorelowane dodatnio ($r = 0.88$) z poziomem OT ($P < 0.0001$) i ujemnie ($r = -0.4$) ($P > 0.05$) z poziomem NA. Ekspresja genu OT-R jak i β_2 -R w CL była ujemnie skorelowana odpowiednio z zawartością OT ($r = -0.76$) ($P < 0.001$) i NA

($r = -0.59$) ($P < 0.05$) w tkance lutealnej.

Uzyskane wyniki świadczą o istnieniu zależności pomiędzy ekspresją genów OT-R i β_2 -R, poziomem białek receptorów OT-R i β_2 -R oraz poziomem OT w stosunku do produkcji P_4 . Wskazuje to na ich wysokie powiązanie w regulacji funkcji wydzielniczej CL u bydła.

Praca wykonana w ramach grantu MNiSW: 2P06D04530

ZWIĘKSZONY ZWROTNY TRANSFER HORMONÓW STEROIDOWYCH JAJNIKA DO TĘTNICY JAJNIKOWEJ W FAZIE LUTEALNEJ U ŚWINI WPŁYWA NA ICH WŁASNE WYDZIELANIE ORAZ WYDZIELANIE AKTYWINY I INHIBINY

INCREASED RETROGRADE TRANSFER OF OVARIAN STEROID HORMONES INTO OVARIAN ARTERY AFFECT THEIR SECRETION AND SECRETION OF ACTIVIN AND INHIBIN IN LUTEAL PHASE OF PORCINE ESTROUS CYCLE

Barbara Wąsowska

*Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, ul.
Tuwima 10, 10-747 Olsztyn, e-mail: bwasow@pan.olsztyn.pl*

Zlokalizowane w krezce jajnika świnie naczynia tętnicze żyłne i limfatyczne tworzą funkcjonalny układ, nazywany przez fizjologów okołojajnikowym kompleksem naczyniowym. W kompleksie tym odbywa się zwrotny transfer hormonów jajnikowych z krwi żyłnej i limfy odpływającej z jajnika do krwi tętniczej zaopatrującej jajnik. Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie czy zwiększone w wyniku zwrotnego transferu stężenie progesteronu (P_4), estradiolu (E_2) lub testosteronu (T) we krwi zaopatrującej jajnik wywołuje ujemne lub dodatnie sprzężenie zwrotne i tą drogą wpływa na ich własną syntezę oraz czy zwiększone stężenie każdego z tych hormonów ma wpływ na syntezę i uwalnianie do krwi żyłnej innych hormonów jajnikowych.

Loszkom będącym w fazie lutealnej cyklu infundowano przez 3 kolejne dni (10, 11, 12 dzień cyklu) do tętnicy jajnikowej po stronie doświadczalnej jeden z hormonów, przez 6 godzin. Dawki hormonów infundowanych w 10 dniu cyklu odpowiadały efektywności ich zwrotnego transferu w tym stadium cyklu. Zostały one wyliczone na podstawie wielkości lokalnego wzrostu ich stężenia w wyniku zwrotnego transferu w okołojajnikowym kompleksie naczyniowym oraz ilości krwi przepływającej w tym czasie tętnicą jajnikową. W 11 dniu cyklu infundowana była podwójna, a w 12 dniu potrójna dawka hormonów. Po stronie kontrolnej infundowano NaCl. Próby krwi pobierano z żył jajnikowych w ciągu 3 godzin (co 30 min.) przed infuzją hormonu oraz po 2-godzinnej przerwie po zakończeniu infuzji przez 6 godzin (co 1 godz.). Tempo infuzji dawki podstawowej hormonów wynosiło: P_4 – 0.62 $\mu\text{g}/\text{min}$, E_2 – 156 pg/min , T – 250 pg/min . Wyniki zostały przedstawione jako zmiany stężenia hormonów w stosunku do ich stężenia przed infuzją w pierwszym dniu doświadczenia, przyjętej jako 100%. Porównywano wartości stężeń uzyskane po infuzji hormonów z wartościami uzyskanymi po stronie kontrolnej, używając testu t dla danych niesparowanych (Prism 4.0, GraphPad, USA).

Infuzje wszystkich dawek P_4 spowodowały wystąpienie dodatniego sprzężenia zwrotnego, w wyniku którego wzrosło jego własne wydzielanie: średnio o 30% po infuzji dawki podwójnej ($P < 0.01$) i przed infuzją dawki potrójnej ($P < 0.05$). Ponadto infuzje P_4 spowodowały wzrost wydzielania T, E_2 , androstendionu (A_4), podjednostki α -inhibiny ($\text{INH}\alpha$) oraz aktywiny A w 12 dniu cyklu. Infuzje E_2 spowodowały ujemne sprzężenie zwrotne i obniżenie jego własnego wydzielania w 12 dniu cyklu: przed infuzją o 135%, ($P = 0.002$) oraz po infuzji o 179% ($P = 0.0002$). Ponadto infuzje E_2 spowodowały: obniżenie wydzielania T, E_1 oraz zależne od dawki zmiany w wydzielaniu P_4 . Nie stwierdzono zmian w wydzielaniu A_4 oraz $\text{INH}\alpha$ pod wpływem E_2 . Infuzje testosteronu nie miały wpływu na jego własne wydzielanie ani wydzielanie $\text{INH}\alpha$, spowodowały natomiast obniżenie wydzielania P_4 , A_4 , E_2 , E_1 .

Przeprowadzone badania wykazały funkcjonowanie sprzężeń zwrotnych pomiędzy pulą przenoszonych zwrotnie do jajnika P_4 i E_2 a ich wydzielaniem, oraz wpływ zwrotnego transferu hormonów steroidowych na wydzielanie innych hormonów jajnikowych. Wyniki te wskazują po raz pierwszy na udział aktywiny A oraz podjednostki α -inhibiny w lokalnym regulacyjnym działaniu zwrotnego transferu hormonów na steroidogenezę jajnikową.

Badania finansowano z grantu KBN 3P06D 02323.

CYTOKINES IN THE MARE ENDOMETRIUM AND CORPUS LUTEUM

CYTOKINY W ŚLUZÓWCE MACICY I CIAŁKU ŻÓŁTYM KLACZY

A Galvão¹, D J Skarzynski², E Silva¹, L Valente¹, L Mateus¹, G Ferreira-Dias¹

¹C.I.I.S.A., Faculty of Veterinary Medicine, T.U. Lisbon, Portugal

²Institute of Animal Reproductive and Food Research of PAS, Olsztyn, Poland

E-mail: gmlfdias@fmv.utl.pt

The influence of the endometrium in the regulation of ovarian function has been well established, for decades. Specifically, during the luteal phase, the relationship between these two structures is quite evident, mainly at the time of luteolysis. Although, how different factors as cytokines (interferon-gamma - IFN γ , tumor necrosis factor - TNF α , Fas Ligand - FasL) do interact for the establishment of different events during the estrous cycle is not well known. Therefore, the main goal of this study was to clarify the possible relationship between the expression of these factors, and their receptors, simultaneously in corpus luteum (CL) and endometrium, during the luteal phase in the mare. Endometria and corpora lutea were obtained *post mortem* from 18 cyclic mares and classified into: i) early luteal phase endometrium (Early-LP) or Early-CL (n= 6); ii) mid luteal phase endometrium (Mid-LP) or Mid-CL (n=6) and iii) late luteal phase endometrium (Late-LP) or Late-CL (n= 6), based on plasma progesterone (P₄) concentration and ovarian structures. After primers design for the target genes (TNF α , TNFR1, FasL and Fas) and for the housekeeping gene (B2MG), optimizations were performed by conventional PCR. Relative quantification of gene expression was accomplished by Real Time PCR (Real Time Miner). In the endometrium, TNF α expression was significantly reduced in the Mid-LP ($p \leq 0.05$), comparing with the other stages of the luteal phase, while its receptor showed the opposite tendency ($p \leq 0.05$). IFN γ was increased in the Late-LP ($p < 0.05$), but its receptor expression did not change. FasL expression was similar to TNF α , being lower in the Mid-LP ($p < 0.05$), while Fas was constant throughout the luteal phase. In the CL, TNF α expression was higher in both Late-CL and Early-CL comparing to Mid-CL ($p < 0.001$) and TNFR 1 expression was increased in the Early-CL with respect to Mid-CL ($p < 0.05$) and Late-CL ($p < 0.01$). IFN γ presented the lowest expression in the Early-CL, increasing afterwards ($p \leq 0.01$). IFN γ Receptor 1 did not show a significant variation during the luteal phase. FasL presented the lowest mRNA expression in the Early-CL, increasing in the Mid-CL ($p < 0.05$) and with no significant difference between Mid-CL and Late-CL. Fas expression was similar during the luteal phase. These results suggest an important (auto/paracrine) role of these cytokines in regulation of both endometrial and luteal functions. The agreement in the expression pattern in the equine endometrium and ovary may evidence similar pathways triggered simultaneously in the luteal phase, in both structures.

This work was supported by Grants POCTI/CVT/39519/2001 and SFRH/BD/29765/2006 from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal and the International Project of Polish Ministry of Science and Higher Education (PORTUGALIA/78/2007).

CYTOKINY W ŚLUZÓWCE MACICY I CIAŁKU ŻÓŁTYM KLACZY

CYTOKINES IN THE MARE ENDOMETRIUM AND CORPUS LUTEUM

A Galvão¹, D J Skarzynski², E Silva¹, L Valente¹, L Mateus¹, G Ferreira-Dias¹

¹C.I.I.S.A., Wydział Medycyny Weterynaryjnej, T.U. Lizbona, Portugalia

²Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn, Polska

E-mail: gmlfdias@fmv.utl.pt

Wpływ endometrium w regulacji funkcji jajników został dobrze udokumentowany podczas ostatnich dekad. Zwłaszcza w ciągu trwania fazy lutealnej związek pomiędzy tymi dwoma strukturami wydaje się być dość oczywisty, szczególnie w trakcie luteolizy. Jednakże nie zostało dobrze poznane w jaki sposób inne czynniki, takie jak np. cytokiny (interferon gamma- IFN γ , czynnik martwicy nowotworów - TNF α , Ligand Fas - FasL) mają wpływ na przebieg poszczególnych etapów cyklu płciowego. W związku z tym głównym celem doświadczenia było wyjaśnienie możliwej zależności pomiędzy ekspresją tych czynników i ich receptorów, jednocześnie w ciałku żółtym (CL) oraz endometrium, w trakcie fazy lutealnej u klaczy. Endometria oraz ciałka żółte otrzymano *post mortem* od 18 klaczy będących w trakcie cyklu. oraz Na podstawie stężenia progesteronu w surowicy (P₄) oraz oceny morfologicznej struktur jajnika sklasyfikowano je na następujące grupy: i) endometria znajdujące się we wczesnej fazie lutealnej (wczesna LP) lub wczesne ciałka żółte (n=6); ii) endometria znajdujące się w środkowej części fazy lutealnej (środkowa LP) lub pośrednie ciałka żółte (n=6) oraz iii) endometria znajdujące się w późnej fazie lutealnej (późna LP) lub późne ciałka żółte (n=6). Po zaprojektowaniu primerów dla genów docelowych (TNF α , TNFR1, FasL oraz Fas) oraz referencyjnego genu B2MG, wykonano optymalizację przy pomocy konwencjonalnego PCR. Ilościową ocenę względnej ekspresji genów wykonano metodą PCR w czasie rzeczywistym (Real Time Miner). Znotowano znaczne zmniejszenie ekspresji TNF α w endometrium w środkowej fazie lutealnej ($p \leq 0.05$), w porównaniu z innymi fazami rozwoju ciałka żółtego, podczas gdy jego receptor wykazał przeciwną tendencję ($p \leq 0.05$). Stężenie IFN γ było zwiększone w późnej fazie lutealnej ($p < 0.05$), jednak ekspresja jego receptora nie zmieniła się. Ekspresja FasL była podobna do TNF α , utrzymując się na niskim poziomie w środkowej fazie lutealnej ($p < 0.05$), podczas gdy Fas utrzymywało się na stałym poziomie poprzez całą fazę lutealną. W ciałku żółtym ekspresja TNF α była wyższa zarówno w późnym oraz wczesnym ciałku żółtym, w porównaniu z ciałkiem żółtym pośrednim ($p < 0.001$), natomiast ekspresja receptora TNF 1 utrzymywała się na zwiększonym poziomie we wczesnym ciałku żółtym w porównaniu z ciałkiem żółtym pośrednim ($p < 0.05$) oraz późnym ($p < 0.01$). IFN γ wykazywał najniższą ekspresję we wczesnym ciałku żółtym, która wzrastała w późniejszym okresie ($p \leq 0.01$). Nie zanotowano znaczących różnic w ekspresji receptora 1 IFN γ w trakcie fazy lutealnej. FasL wykazał najmniejszy stopień ekspresji mRNA we wczesnym ciałku żółtym, wzrastający w ciałku żółtym pośrednim ($p < 0.05$), przy braku znaczących różnic pomiędzy ekspresją w ciałku żółtym pośrednim i późnym. Ekspresja Fas była podobna w trakcie całej fazy lutealnej. Wyniki te sugerują, iż cytokiny te pełnią ważną rolę (auto/parakrynową) w regulacji zarówno funkcji endometrialnych, jak i lutealnych. Zgodność w sposobie ekspresji w endometrium oraz jajniku klaczy może wskazywać na jednoczesne uruchamianie podobnych szlaków przekazywania sygnału w trakcie fazy lutealnej w obu strukturach.

Praca ta została wsparta przez grant POCTI/CVT/39519/2001 oraz SFRH/BD/29765/2006 z Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugalia oraz przez Międzynarodowy Projekt Polskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (PORTUGALIA/78/2007).

LEUKOTRIENY W KOMÓRKACH STEROIDOGENNYCH CIAŁKA ŻÓŁTEGO KROWY PODCZAS CYKLU RUJOWEGO I WCZESNEJ CIAŻY

LEUKOTRIENES IN THE BOVINE STEROIDOGENIC LUTEAL CELLS DURING THE ESTROUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY

Anna Korzekwa*, Karolina Łukasik, Izabela Wocławek-Potocka*, Dariusz J. Skarżyński

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, PAN Olsztyn, Zakład Immunologii Rozrodu
aniak@pan.olsztyn.pl*

WPROWADZENIE: Leukotrieny obok prostaglandyn i tromboksanu należą do grupy biologicznie czynnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych nazywanych eikozanoidami. Leukotrieny (LTs) są 20-węglowymi metabolitami kwasu arachidonowego syntetyzowanymi *de novo* przy udziale 5-lipoksygenazy (5-LO). Synteza LTs odbywa się w różnych kompartmentach komórkowych: w cytozolu powstaje leukotrien B₄ (LTB₄), podczas gdy w reakcji katalizowanej przez syntazę LTC₄ występującej w błonie jądrowej tworzony jest leukotrien C₄. We wcześniejszych badaniach określiliśmy, że działanie leukotrienu B₄ na układ rozrodczy krowy *in vivo* (15 dzień cyklu jajnikowego) jest uzależnione od dawki: podanie LTB₄ w infuzji do aorty w dawce 10 µg spowodowało efekt luteolityczny, a dawka 25 µg przedłużyła trwanie fazy lutealnej i wpływała luteotropowo (stymulacja wydzielania progesteronu - P4) na ciało żółte (CL) krowy. Natomiast działanie LTC₄ jest luteolityczne w każdym zakresie dawek. Jednakże rola LTs w regulacji lokalnych funkcji jajnika, a szczególnie CL krowy nie jest dotychczas wyjaśniona.

CEL BADAŃ: Określenie czy LTs mogą pełnić funkcje auto-parakrynych czynników w regulacji CL, zarówno w cyklu jajnikowym, jak i w ciąży u krowy poprzez: (1) poznanie profilu ekspresji enzymu odpowiedzialnego za produkcję LTs (5-LO) i ich receptorów (LTR-1 i LTR-2) oraz (2) wykazanie wpływu czynników luteotropowych i luteolitycznych na uwalnianie LTC₄ i B₄ w komórkach CL krowy.

MATERIAŁ I METODY: W CL pozyskanych od krów poubojowo (wczesna: 2-3 dzień, środkowa: 8-9, późna faza lutealna: 17-18 dzień cyklu oraz we wczesnej ciąży: w dniach 8-9 i 17-18) oznaczono profil ilościowej ekspresji genów dla 5-LO, LTR-1 i LTR-2 metodą *Real Time PCR* oraz stężenie LTB₄ i C₄ metodą *EIA*. Komórki CL izolowane metodą enzymatyczną po 24 h preinkubacji stymulowano przez kolejne 24 h czynnikami luteotropowymi: LH (100 ng/ml), PGE₂ (10⁻⁶M) i luteolitycznymi: PGF_{2α} (10⁻⁶M) i TNF/IFNγ (50 ng/ml).

WYNIKI: Cytokiny stymulowały ekspresję 5-LO oraz LTR-1 w komórkach CL tylko we wczesnej fazie cyklu rujowego (P<0.05). Ekspresja LTR-2 w komórkach wzrosła pod wpływem cytokin i PGF_{2α} we wczesnej i późnej fazie cyklu oraz po stymulacji cytokinami w 17-18 dniu ciąży (P<0.05).

Wydzielanie LTB₄ w komórkach wzrosło po stymulacji cytokinami we wczesnej fazie cyklu (P<0.05), natomiast wszystkie czynniki luteotropowe i luteolityczne hamowały wydzielanie LTB₄ w środkowej i późnej fazie (P<0.05). Nie wykazano wpływu badanych czynników na wydzielanie LTs w ciąży (P>0.05).

Wydzielanie LTC₄ nie zmieniło się pod wpływem badanych czynników we wczesnej fazie cyklu i ciąży, z wyjątkiem stymulacji przez cytokiny w 17-18 dniu ciąży. W późnej fazie cyklu obie prostaglandyny i cytokiny zwiększyły wydzielanie LTC₄ w komórkach steroidogennych CL krowy (P<0.05).

WNIOSKI: Leukotrieny jako czynniki auto-parakryne mogą być w regulację funkcji jajnika, w tym CL krowy, a ich synteza i ekspresja ich receptorów zmieniają się podczas cyklu i we wczesnej ciąży. Leukotrieny, głównie LTB₄, mogą być mediatorami działania prostaglandyn i cytokin (TNF/IFNγ) podczas tworzenia się i wczesnego rozwoju CL. Jednakże, pod koniec cyklu LTs, a w szczególności LTC₄, mogą pełnić funkcje modulatora/mediatora PGF_{2α} i cytokin podczas regresji CL krowy.

*A.K., I.W-P. - stypendystki Programu START FNP.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSW 2P06D 004 30

ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY LICZBĄ CIAŁEK ŻÓŁTYCH A WZROSTEM PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH U KÓZ W CIĄŻY

RELATIONSHIP BETWEEN NUMBER OF CORPORA LUTEA AND FOLLICULOGENESIS IN PREGNANT GOATS

Tomasz Schwarz¹, Edward Wierchoś²

¹Katedra Hodowli Trzody Chlewnej

²Katedra Hodowli Owiec i Kóz

Uniwersytet Rolniczy, 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 24/28

Celem przeprowadzonych badań było określenie poziomu folikularnej aktywności jajników ciężarnych kóz, mierzonej liczbą pęcherzyków rosnących, w zależności od poziomu owulacji i liczby ciałek żółtych, jak również od rozmieszczenia ciałek żółtych pomiędzy prawym i lewym jajnikiem w przypadku owulacji mnogich.

Obserwacje przeprowadzono na sześciu kozach rasy polska biała uszlachetniona utrzymywanych w warunkach naturalnego dnia świetlnego w Stacji Doświadczalnej Katedry Hodowli Owiec i Kóz na Bielanach koło Krakowa. Doświadczenie polegało na codziennej wizualizacji jajników kóz od momentu wykrycia rui w grudniu, aż do porodu w maju. W obserwacjach wykorzystano technikę transrektalnej, szerokopasmowej ultrasonografii w zakresie wysokich częstotliwości, stosując skaner Aloka SSD 500 wyposażony w liniową sondę o częstotliwości 7,5 MHz przystosowaną do badania *per rectum*. Dla każdej kozy wykonano diagram profilu indywidualnego wzrostu pęcherzyków jajnikowych. Analizy danych objęły porównanie liczby pęcherzyków rosnących w ciągu całej ciąży w jajnikach kóz w zależności od poziomu owulacji i związanej z tym liczby ciałek żółtych ciążowych, oraz porównanie liczby pęcherzyków rosnących w zależności od rozmieszczenia ciałek żółtych ciążowych w jajnikach. Istotność różnic szacowano przy użyciu testu t-Studenta.

Średnia liczba pęcherzyków jajnikowych rosnących w ciągu całej ciąży wyniosła $42 (\pm 14,4)$, z tego 16 ($\pm 7,7$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm, czyli średnicę pęcherzyka potencjalnie zdolnego do owulacji. Poziom owulacji wahał się od 1 do 3. Trzy ciała żółte odnotowano u jednej kozy (4), dwa ciała żółte u czterech (1, 2, 3, 6), zaś jedno ciało żółte u jednej kozy (5). U kozy nr 4 w czasie ciąży rosło 60 pęcherzyków, u kozy nr 5 49 pęcherzyków, zaś u pozostałych kóz średnio $34,25 (\pm 8,66)$ pęcherzyków. Współczynnik korelacji pomiędzy liczbą ciałek żółtych a liczbą rosnących pęcherzyków wyniósł 0,27 i był nieistotny ze statystycznego punktu widzenia. Kolejna analiza objęła liczbę pęcherzyków rosnących w zależności od rozmieszczenia ciałek żółtych w jajnikach, pomijając aspekt ich liczebności. Kozy podzielono na dwie grupy: 1. ciało żółte w jednym jajniku (n:0) (kozy 1, 4, 5); 2. ciała żółte w obydwu jajnikach (n:n) (kozy 2, 3, 6). Średnia liczba pęcherzyków rosnących w grupie 1 wyniosła $52 (\pm 11,3)$, z tego 21 ($\pm 7,1$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm. Wartości te były istotnie wyższe ($P \leq 0,05$) niż w grupie 2, gdzie wyniosły $30 (\pm 2,8)$ pęcherzyków w tym 10 ($\pm 2,8$) o średnicy ≥ 5 mm. Dodatkową analizę wykonano dla pojedynczych jajników. Średnia liczba pęcherzyków rosnących w jajniku z ciałkiem żółtym (n=9) wyniosła $13,7 (\pm 2,3)$ z tego 4,4 ($\pm 1,3$) osiągnęło średnicę ≥ 5 mm. Wartości te były istotnie niższe ($P \leq 0,01$) niż w przypadku jajników bez ciała żółtego (n=3), w których odnotowano wzrost 41 (± 7) pęcherzyków, w tym 18 (± 5) o średnicy ≥ 5 mm.

Podsumowując, dla liczby pęcherzyków jajnikowych rosnących czasie ciąży u kóz, rozmieszczenie ciałek żółtych w jajnikach okazało się znacznie ważniejsze od ich całkowitej liczby wynikającej z poziomu owulacji. Zdecydowana większość pęcherzyków rozwijała się w jajnikach w których nie uformowało się ciało żółte.

UNERWIENIE TORBIELOWATO ZMIENIONYCH JAJNIKÓW ŚWIŃ

THE INNERVATION OF CYSTIC-CHANGED PORCINE OVARIES

Anna Kozłowska, Barbara Jana

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn,
andzik@pan.olsztyn.pl*

Zwyrodnienie torbielowate jajników (ZTJ) jest częstym i poważnym schorzeniem u samic zwierząt gospodarskich, głównie krów, powodującym czasową lub trwałą niepłodność. Ten patologiczny stan powstaje w wyniku upośledzenia owulacji jednego lub kilku pęcherzyków, przekształcających się w jeden lub kilka jedno, czasami wielokomorowych tworów różnej wielkości, noszących miano torbieli. Pomimo wieloletnich badań, etiopatogeneza tego schorzenia nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Obecnie przyjmuje się, że torbiele powstają najczęściej w wyniku zakłóceń współzależności sekrecyjnych pomiędzy podwzgórzem, przysadką, a jajnikiem. Z badań przeprowadzonych u kobiet, szczurów i świń wynika, że zmiany w aktywności włókien nerwowych zaopatrujących jajniki mogą być jedną z przyczyn powstania i/lub przebiegu ZTJ. O istotnej roli obwodowego układu nerwowego w etiopatogenezie tego schorzenia świadczy fakt, iż przecięcie nerwu jajnikowego najwyższego przywróciło prawidłowy cykl menstruacyjny u kobiet, u których terapia hormonalna okazała się nieskuteczna. Ponadto, wyniki doświadczeń wykonanych na szczurach i świniami wskazują, że nadmierna aktywacja włókien adrenergicznych na terenie jajnika przyczynia się do rozwoju i utrzymania torbieli jajnikowych.

Celem niniejszej prezentacji jest przedstawienie unerwienia adrenergicznego, cholinergicznego i peptydergicznego torbielowato zmienionych jajników świń. Wykład został przygotowany w oparciu o wyniki własnych badań oraz dane literaturowe.

W torbielowato zmienionych jajnikach kobiet obserwowano zwiększenie gęstości autonomicznych włókien nerwowych. Badania własne przeprowadzone na loszkach, u których *status polycysticus* jajników indukowano podawaniem deksametazonu (syntetyczny glikokortykosteroid, DXM) wykazały, iż zmianom w morfologii gonad towarzyszył wzrost liczby włókien adrenergicznych (zawierających β -hydroksylazę dopaminy i/lub nuropeptyd Y) wokół ścian torbieli, pęcherzyków o średnicy 1-3 mm i naczyń krwionośnych. Co więcej, zwiększona gęstość włókien adrenergicznych w torbielowato zmienionych jajnikach związana była z podwyższoną zawartością noradrenaliny - neuroprzekaźnika układu adrenergicznego. W pobliżu ścian torbieli, pęcherzyków pierwszo- i drugorzędowych oraz naczyń krwionośnych na terenie tych gonad, zmieniła się również dystrybucja i gęstość włókien cholinergiczych (immunoreaktywnych dla naczyniowego transportera acetylocholin i/lub neuronalnej izoformy syntazy tlenu azotu, wazoaktywnego peptydu jelitowego, somatostatyny, substancji P – SP) oraz peptydergiczych (pozytywnych dla SP i/lub galaniny, peptydu kodującego gen kalcytoniny). Omawiając zmiany w dystrybucji włókien nerwowych w torbielowato zmienionych jajnikach nie można pominąć udziału czynnika wzrostu nerwów (NGF) w tym schorzeniu. W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano, że formowanie się torbieli poprzedzał wzrost ekspresji NGF i jego receptora o niskim powinowactwie (p75^{NTR}). Co więcej, w badaniach własnych stwierdzono wzrost ekspresji białka NGF i p75^{NTR} oraz gęstości włókien adrenergicznych w jajnikach loszek w trakcie rozwoju torbieli.

Wyniki badań pokazują, że w torbielowatych jajnikach zmienia się unerwienie adrenergiczne, cholinergiczne i peptydergiczne. Uzyskane rezultaty sugerują, że obwodowy układ nerwowy wpływając na funkcję torbielowatego jajnika (aktywność steroidogenną i/lub przepływ krwi) może uczestniczyć w przebiegu tego schorzenia.

SESJA SATELITARNA

Przełom w rozrodzie małych zwierząt

SATELLITE SESSION

New challenges in small Animals reproduction

**ZNACZENIE PROLAKTYNY W FIZJOLOGII I PATOLOGII
ROZRODU PSÓW**

**PROLACTINE IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL
REPRODUCTIVE PROCESSES IN DOGS**

Hartwig Bostedt

B R A K A B S T R A K T U

A B S T R A C T N O T A V A I L A B L E

TERAPIA ŁAGODNEGO ROZROSTU GRUCZOŁU KROKOWEGO Z UŻYCIEM TABLETEK OCTANU OZATERONU: BADANIE NA PSACH RASOWYCH

TREATMENT OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA WITH OSATERONE ACETATE TABLETS: A STUDY IN BREEDING DOGS

Mimouni P.¹, Noullet M.¹, Albouy M.², Sanquer A.², Fontaine E.³

¹ Veterinary clinic, L'Isle-Jourdain, France; ² Virbac S.A, France.,

³ French National Veterinary School of Maisons-Alfort.

Cel pracy

U psów łagodny rozrost gruczołu krokowego (Benign Prostatic Hyperplasia – BPH) jest naturalną konsekwencją starzenia się organizmu. U ponad 80% psów w wieku powyżej 5 lat obserwuje się problemy związane z rozrostem prostaty. Stosowanie anty-androgenów jest interesującą alternatywą w stosunku do zabiegu chirurgicznego w celu zmniejszenia zarówno elementów tkanki gruczołowej jak i zrębu łącznotkankowego gruczołu.

Celem tego badania było określenie efektu działania terapii tabletkami octanu ozateronu (YPOZANE®, Virbac) na popęd seksualny i jakość nasienia u psów rasowych z łagodnym rozrostem prostaty.

Material i metody

U psów włączonych do badania zdiagnozowany był łagodny rozrost prostaty (z widocznymi lub bez ogólnych objawów klinicznych) potwierdzony badaniem USG. Psy leczone były tabletkami octanu ozateronu (0,22 mg/kg masy ciała), podawanymi raz dziennie przez 7 kolejnych dni.

Objętość gruczołu krokowego (mierzona badaniem USG), libido i jakość nasienia oceniane były przed i po terapii. Ocena powtarzana była 6 razy podczas blisko 5-cio miesięcznego okresu (D-7, D0, D14, D45, D70 i D135).

Wyniki

Z 18 psów różnych ras włączonych do badania, 15 spełniało wszystkie kryteria włączenia/zakończenia próby.

Octan ozateronu ma szybki i znaczący wpływ na zmniejszenie objętości prostaty (średni procent zmniejszenia: 47% ± 18% w czasie 2 tygodni). Zmniejszenie objętości prostaty wciąż było obserwowane pod koniec okresu prowadzonego badania.

Parametry określające jakość nasienia (ruchliwość plemników, morfologia i stężenie plemników) prezentowały znaczną naturalną zmienność.

Leczenie przy użyciu octanu ozateronu nie wywołało żadnych zmian jakości nasienia i libido w okresie 2 cykli spermatogenezy.

Wnioski

Krótką terapią octanem ozateronu w postaci tabletek, stosowanych raz dziennie przez 7 dni jest skutecznym, dającym trwały efekt i bezpiecznym postępowaniem terapeutycznym w leczeniu łagodnego rozrostu gruczołu krokowego u psów rasowych.

Szczególne znaczenie w tym badaniu miał fakt zachowania na niezmiennym poziomie zarówno popędu seksualnego jak i jakości nasienia u leczonych psów.

**NOWE MOŻLIWOŚCI LECZENIA ŁAGODNEGO ROZROSTU
PROSTATY U PSÓW**

**NEW ALTERNATIVE IN TREATMENT OF BENIGN PROSTATIC
HYPERPLASIA IN DOGS**

Zdzisław Boryczko, S. Giziński

B R A K A B S T R A K T U

A B S T R A C T N O T A V A I L A B L E

WSPÓLCZESNE POGLĄDY NA METODY UNASIENNIA SUK (NASIENIE ŚWIEŻE, SCHŁODZONE I MROŻONE) ORAZ WYZNACZANIE OPTIMALNEGO TERMINU KRYCIA

CURRENTLY USED METHODS OF ARTIFICIAL INSEMINATION IN BITCHES WITH FRESH, CHILLED OR FROZEN SEMEN AND DETERMINATION OF OPTIMAL BREEDING TIME

Wojciech Niżański, Jan Twardoń, Michał Dziecioł

*Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przewodzących i Ochrony Zdrowia Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

W ostatnich latach w krajach europejskich, w tym w Polsce, obserwuje się rosnące zainteresowanie praktycznym stosowaniem biotechnik rozrodu u psów rasowych. Środowisko hodowców dostrzegło zalety wykorzystania tego rodzaju procedur, stosowanych już od wielu lat zarówno w medycynie człowieka, jak i w weterynarii zwierząt gospodarskich. Najczęściej obecnie stosowanymi technikami wspomaganego rozrodu u psów są: konserwacja nasienia, sztuczna inseminacja i wyznaczenie optymalnego terminu unasienniania.

W celu sztucznej inseminacji suk stosowane jest w przeważającej części przypadków nasienie świeże, niezależnie od kraju i kontynentu. Dzieje się tak z dwóch powodów. Po pierwsze zdolność zapładniająca plemników nasienia świeżego i ich przeżywalność w drogach rodnych samicy są tak duże, że skuteczność unasienniania jest relatywnie wysoka niezależnie od drogi i miejsca podania nasienia. Po drugie prosta technicznie inseminacja dopochwowa okazuje się w wielu przypadkach wystarczająca dla uzyskania ciąży. Jednak unasiennianie nasieniem świeżym niesie za sobą niedogodności. Nasienie powinno być wprowadzone do układu rozrodczego samicy tuż po jego pobraniu. Konieczne jest zatem zorganizowanie transportu zwierząt i umożliwienie jednoczesnej wizyty samca i samicy w ambulatorium. Aby ominąć te trudności oraz aby umożliwić zachowanie rezerwy puli genowej cennych genetycznie samców, tworzone są w wielu krajach banki mrożonego nasienia psów reproduktorów. Nasienie takie może być przechowywane przez kilkadziesiąt lat. Koszty mrożenia nasienia i transportu nasienia mrożonego są jednak wysokie. Aby przeprowadzić procedurę zamrażania potrzebne są odczynniki, sprzęt, wiedza i doświadczenie w tej dziedzinie. Ponadto istnieje bezwzględna konieczność domacicznego wprowadzenia nasienia rozmrożonego. Unasiennianie dopochwowe skutkuje tu bowiem bardzo niskim odsetkiem suk szczennych! Ponadto plemniki rozmrożone cechują się bardzo krótkim okresem przeżywalności (<24 godz). Pomimo tego korzyści wynikające z mrożenia nasienia (możliwość transportu, przechowywanie wiele lat, niezależność czasu pobrania i inseminacji) są tak ogromne, że technika ta jest obecnie szeroko stosowana w wielu krajach, w tym nabiera popularności w Polsce. Ze względu na koszty i trudności związane z mrożeniem nasienia, od wielu lat trwają badania nad taką techniką konserwacji w stanie płynnym, aby możliwe stało się zachowanie zdolności zapładniającej plemników przez 7-10 dni. W ostatnich 2-3 latach zostało to osiągnięte. Zatem konserwacja w stanie płynnym tj. przechowywanie rozrzedzonego nasienia w 5°C staje się bardzo interesującą alternatywą dla mrożenia nasienia. Łatwy bowiem stał się transport lotniczy lub samochodowy nasienia zamkniętego w termostabilnych opakowaniach neoporowych po wyznaczeniu optymalnego terminu krycia u suki, w sytuacji gdy istnieje gwarancja, że plemniki zachowają zdolność zapładniającą przez tydzień.

Najczęściej wykonywaną obecnie techniką sztucznej inseminacji jest unasiennianie dopochwowe z użyciem kateteru infuzyjnego. Inny rodzaj inseminacji przewiduje zastosowanie kateteru Foleya. Metoda ta jest jednak kontrowersyjna i posiada szereg niedogodności praktycznych. Stosowane rodzaje inseminacji domacicznej to technika skandynawska, waginoskopowa, laparoskopowa i popularne w Ameryce Północnej unasiennianie drogą laparotomii. Przeprowadzone ostatnio badania przemawiają jednoznacznie, że unasiennianie domaciczne daje nie tylko korzystne wyniki w odniesieniu do nasienia mrożonego/rozmrożonego, ale pozwala uzyskać również wyższy odsetek suk szczennych również wtedy, gdy stosowane jest nasienie świeże. Z tego powodu promowane w chwili obecnej w ośrodkach europejskich są niechirurgiczne metody inseminacji domacicznej: waginoskopowa i skandynawska. Należy jednoznacznie podkreślić, że przy każdym rodzaju inseminacji konieczne staje się wyznaczenie optymalnego terminu unasienniania w oparciu o badanie kliniczne, badanie cytologiczne wymazów pochwowych, badanie waginoskopowe, pomiary stężenia hormonu luteinizującego lub progesteronu we krwi obwodowej. Mniej dokładne i rzadziej stosowane metody to analiza form krystalizacji śluzu pochwowego oraz pomiary przewodnictwa elektrycznego śluzu pochwowego.

ZASTOSOWANIE AGLEPRISTONU DO PRZERYWANIA PÓŹNEJ CIAŻY, WYWOŁYWANIA PORODU ORAZ LECZENIA GUZÓW POCHWY U SUK I KOTEK

THE USE OF AGLEPRISTONE TO LATE PREGNANCY TERMINATION, INDUCTION OF DELIVERY AND TREATMENT OF FIBROMA IN VAGINA OF BITCH AND QUEENS

Piotr Jurka

*Zakład Rozrodu Zwierząt, Katedra Nauk Klinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW,
ul. Nowoursynowska 159C, 02-766 Warszawa*

Jednym z głównych hormonów steroidowych regulujących funkcje układu rozrodczego u suk jest progesteron odpowiedzialny m.in. za hamowanie aktywności skurczowej *myometrium*, zamknięcie szyjki macicy oraz stymulację wydzielania przez gruczoły maciczne. Aglepriston (Alizine, Virbac) jako antygestagen blokuje działanie progesteronu, wypierając go z jego receptorów w układzie rozrodczym z powinowactwem 3-krotnie wyższym w porównaniu do progesteronu zaś u kotów aż 9-krotnie. Zniesienie tych funkcji poprzez zastosowanie aglepristonu umożliwia przerywanie wczesnej i późnej ciąży, wywoływanie porodu oraz hamowanie rozwoju guzów nowotworowych poprzez blokowanie receptorów progesteronowych(1,2,3).

Lekarze weterynarii w swojej praktyce często spotykają się z problemem przypadkowego krycia i wynikającej z niego niepożądanego ciąży. Aglepriston można bezpiecznie i skutecznie użyć na każdym etapie ciąży, rozpoczynając od 7 dnia aż do 45 dnia po pokryciu w dawce 10 mg/kg m.c. (dwukrotnie, co 24h, w razie konieczności ponownie po 7 dniach). Lekarz weterynarii na bieżąco śledzący doniesienia na ten temat stykają się jednak ze sprzecznymi poglądami iż należy go stosować wyłącznie we wczesnej ciąży lub dopiero po jej rozpoznaniu (1,5). Argumenty za i przeciw takiemu stosowaniu aglepristonu zostaną przedstawione w dysertacji.

Do wskazań zastosowania aglepristonu w celu indukcji porodu, oprócz choroby matki można zaliczyć: wywoływanie porodu na życzenie właściciela, opóźniający się poród, zespół jednego szczenięcia lub podanie długodziałających gestagenów w czasie ciąży(1,2). Dotychczas przeprowadzono mało doświadczeń z wywoływaniem porodu u suk i kotek. Przyjmuje się pogląd iż sam antygestagen nie jest wystarczający do wywołania kompletnego porodu z powodu braku bezpośredniego działania skurczowego na mięśniówkę macicy(2). W kolejnych badaniach wykorzystywano aglepriston w (2x co 24 godziny) w dawce 15mg/kg po 58 dniu ciąży w połączeniu z oksytocyną (0,15 j.m./kg) lub z prostaglandyną F2 α (0,08 mg/kg) co 2 godziny, do zakończenia porodu. Poród rozpoczął się 32 godziny po pierwszym podaniu aglepristonu. We krwi obwodowej stwierdzono wzrost stężenia progesteronu oraz wydalenie płodów przy wysokim jego stężeniu. Reasumując, aglepriston jest bezpiecznym i skutecznym środkiem do wywołania porodu, natomiast dodatkowe zastosowanie oksytocyny skracza czas porodu (2). Stosowanie takiego schematu wywoływania porodu nie chroni jednak przed dystocją spowodowaną na przykład niewłaściwą postawą lub ułożeniem płodu.

Niektóre łagodne formy guzów nowotworowych w postaci zmian rozrostowych można leczyć przy zastosowaniu aglepristonu. Warunkiem jest wysoka zawartość receptora progesteronowego w tkance guza (4). Do takich zmian należą włókniakogruczolak (fibroadenoma) u kotów oraz łagodne formy guzów nowotworowych pochwy u suki (włókniak- fibroma). Skuteczność takiego leczenia w przypadku guza pochwy zostanie przedstawiona na wykładzie.

1. Fieni F, Battut I, Bruyas JF et al. Evaluation of the Reproductive function after termination of pregnancy in the bitches by use of aglepristone. In: Proceeding of the First Congress Europ Vet Soc Small Anim Reprod, Clin Reprod, 1998.
2. Fieni F., Martal J., Marnet P., G., Siliart B., Guittot F. : Clinical, biological and hormonal study of mid-pregnancy termination in cats with aglepristone Theriogenology 2006, 66,1721-1728
3. Jurka P. Porównanie dwóch metod przerywania niepożądanego ciąży u suk .Med Wet. 2005,63,201-209.
4. Rollon E., Millan Y., De las Mulas M. :Effects of aglepristone, a progesterone receptor antagonist, in a dog with a vaginal fibroma. J. Small. Anim. Pract. 2008,49,41-43.
5. Rootvelt V., Farstad W.: Misalliance treatment in the bitch; before or after confirmed pregnancy? VI conference EVSAR, Estoril, Portugal, 2007, 130.

ZASTOSOWANIE AGLEPRISTONU W ZAPOBIEGANIU CIĄŻY PO PRZYPADKOWYM KRYCIU U SUK I W LECZENIU WŁÓKNIAKOGRUCZOLAKA U KOTEK

EARLY PREVENTIONM OF PREGNACY IN BITCHES AND FELINE FIBROADENOMA TREATMENT WITH AGLEPRISTONE (ALIZINE,VIRBAC)

Sławomir Giziński , Zdzisław Boryczko

*Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii
Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie*

Niechciane (przypadkowe) krycie suk jest częstym problemem spotykanym w hodowlach psów jak i też u indywidualnych właścicieli. Krycie takie ma niekiedy charakter wsobny, często wiąże się z dysproporcjami wielkości między samcem i samicą, czego wynikiem może być zamieranie płodów oraz zaburzony przebieg porodu. U kotek problem przypadkowego krycia występuje rzadziej, ale także spotykany jest u samic trzymanyh w domach z możliwością wychodzenia na dwór.

W przypadkach, gdy właściciel z różnych powodów nie chce mieć miotu, lekarz weterynarii może wprowadzić następujące metody postępowania:

1. Zastosowanie leków „wczesnoporonnych” w późnym estrus lub wczesnym diestrus uniemożliwiających implantację, powodujących zamarcie zarodka (przed zdiagnozowaniem ciąży).
2. Zastosowanie leków przerywających ciążę po jej zdiagnozowaniu.
3. Chirurgiczne usunięcie ciężarnej macicy po wczesnym stwierdzeniu ciąży.

Dotychczas używane środki farmakologiczne do wczesnego usuwania ciąży wykazywały dość duży odsetek powikłań, niejednokrotnie uniemożliwiając dalsze wykorzystanie samicy do rozrodu. Stąd pogląd, iż dla zachowania funkcji rozrodczych bezpieczniejszy jest poród niechcianego miotu niż farmakologiczne przerywanie ciąży.

W ostatnich latach wprowadzono do praktyki weterynaryjnej antgestageny związku będące wybiórczymi blokerami receptorów progesteronowych. Wydają się być one najlepiej tolerowane przez suki niż dotychczas stosowane leki a skuteczność antykoncepcyjna wynosi do 100%. Stosowany w weterynarii aglepriston wiążąc się z receptorem progesteronowym eliminując jego działanie biologiczne na narządy efektorowe – macicę, gruczoł mlekowy

Ponad to podaje się je tylko w dwukrotnej iniekcji w ciągu 24h w dowolnym terminie od dnia krycia do implantacji dzień. Dawka wynosi 10 mg / kg. Wczesne podanie aglepristonu (0-25 dzień) wykazywało 100% skuteczność.

U kotek schemat stosowania jest podobny, także dwie iniekcje w odstępach 24 h w dawce 15mg/kg począwszy od dnia krycia.

Włóknioakogruczolak kotek

Włóknioak – gruczolak (*fibroadenoma*, mammary fibroepithelial hyperplasia) jest niezłośliwym rozrostem elementów gruczołowych i tkanki włóknistej gruczołu mlekowego występującym głównie u młodych kotek. Klinicznie zmiany, które mogą wstępować u kotek zwykle poniżej 1 roku życia manifestują się rozrostem gruczołów mlekowych często obustronnym. Dochodzi do obrzmienia i znacznego powiększenia gruczołów, któremu często towarzyszy stan zapalny, gruczoły są konsystencji twardej do ciastowatej. Rozrost gruczołu dokonuje się pod wpływem progesteronu i progestagenów stąd schorzenie obserwuje się najczęściej w fazie *diestrus*, w trakcie trwania ciąży lub po podaniu preparatów progestagennych. Terapia włóknioakogruczolaka u kotek dotychczas polegała na wykonaniu zbiegu ovariectomii i leczeniu objawowym za pomocą antybiotyków i leków przeciwobrzękowych. W przypadkach powikłań w postaci zgorzelinowych stanów zapalnych konieczne są rozległe zabiegi mastektomii zajętych procesem chorobowych gruczołów. Zmiany po usunięciu jajników i macicy cofają się wolno do 4 – 6 tygodni, a wykonanie zabiegu u kotek, u których *fibroadenoma* wystąpiła po iniekcji progestagenów może nie przynieść rezultatu. U wszystkich kotek, u których był stosowany aglepriston nastąpiła regresja guzów a jej szybkość zależała od dawki i częstotliwości podawania w stosunku wprost proporcjonalnym.

Terapia zachowawcza z użyciem, antygestagenów jest obiecującą alternatywą dla terapii chirurgicznej, która w sposób nieodwracalny likwiduje zdolności rozrodcze zwierzęcia.

ZASTOSOWANIE AGLEPRISTONU W LECZENIU KOMBINOWANYM ZAPALEŃ BŁONY ŚLUZOWEJ MACICY U SUK

THE USE OF AGLEPRISTONE IN COMBINED THERAPY OF ENDOMETRITIS IN BITCHES

Wojciech Niżański, Jan Twardoń, Michał Dziecioł

*Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy i Ochrony Zdrowia Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu*

Zespół zapalenie błony śluzowej macicy-ropomacicze jest jedną z najpoważniejszych i najczęstszych chorób układu rozrodczego suk. Objawy choroby występują w okresie dioestrus/anoestrus, a istotną rolę w jej etiopatogenezie odgrywa podwyższone stężenie progesteronu w fazie lutealnej cyklu jajnikowego. Rutynową metodą leczenia jest owariohisterektomia, która w oczywisty sposób wyklucza sukę z programu hodowlanego. W ostatnich latach opracowano szereg metod leczenia farmakologicznego tego schorzenia, z wykorzystaniem m.in. antygestagenów, prostaglandyny $F_{2\alpha}$, środków dopaminergicznych. Nadrzędnym celem terapii zachowawczej jest zachowanie zdolności reprodukcyjnych samicy.

Celem badań była ocena efektywności kombinowanego leczenia zachowawczego zapalenia błony śluzowej macicy z zastosowaniem antygestagenu, prostaglandyny $F_{2\alpha}$ i bromokryptyny.

Badania przeprowadzono na 28 sukach rasowych w wieku 1,5 do 6 lat, o masie ciała 7 do 50 kg z objawami zapalenia błony śluzowej macicy rozwijającego się przy otwartej szyjce macicznej. Do leczenia zakwalifikowano suki wykazujące ropny wypływ z dróg rodnych, przy potwierdzonym ultrasonograficznie powiększeniu macicy wypełnionej płynem. Badaniami objęto samice w zadowalającym stanie ogólnym, bez objawów uszkodzenia narządów mięsowych (GOT, GPT, mocznik kreatynina w granicach normy fizjologicznej). Wszystkie samice otrzymywały aglepristone (Alizine, Virbac) 10 mg/kg mc podskórnie w dniach terapii D1, D2 i D8, naturalną prostaglandynę $F_{2\alpha}$ –PG (Dinolytic, Pfizer) 20µg/kg mc podskórnie 3x dziennie w dniach terapii D3-D15 oraz bromokryptynę (Bromergon, Lek; Pseudograin, Werfft) w dawce 20µg/kg mc doustnie w dniach D3-D15. U samic stosowano ponadto płynoterapię wspomagającą. Wszystkie suki otrzymywały antybiotyki dobierane względem diagramu wrażliwości przez okres czasu zależny od zmian obrazu klinicznego. W dniach D1, D7, D15, D30 oraz w następnym cyklu rujowym przeprowadzano kompleksowe badanie zwierzęcia: kliniczne, ultrasonograficzne macicy, cytologiczne wymazów pochwowych, badanie krwi i pomiary stężenia progesteronu.

Wszystkie samice w dniu D1 wykazywały brak apetytu, objaw poliuria/polidypsja PU/PD, żółty, zielony bądź brunatny ropny wypływ z dróg rodnych (zdegenerowane neutrofile). Średnia grubość rogu macicy w dniu D1 wynosiła 28 mm, przy widocznym rozszerzonym świetle macicy wypełnionym płynem. Liczba leukocytów we krwi obwodowej wynosiła średnio 31 G/l, przy przyspieszonym odczynie Biernackiego OB (średnio 15/33). Terapia okazała się skuteczna u 24 suk. Ze względu na brak poprawy stanu ogólnego 4 suki poddano owariohisterektomii na życzenie właściciela. W 24 przypadkach wyraźną poprawę stanu ogólnego (apetyt, wycofywanie się PU/PD) obserwowano już w dniach D2-D3. Średnica rogów macicznych ulegała u nich zmniejszeniu średnio o 81% w D7 a w D30 osiągała rozmiary typowe dla rasy. Po początkowym zwiększeniu objętości wypływu z dróg rodnych (D2-D4) obserwowano postępujący jego zanik. Do dnia D15 wypływ stawał się skąpy, bezbarwny, a do dnia D30 w większości przypadków zanikał. W 3 przypadkach wypływ utrzymywał się przez 40-45 dni. Liczba leukocytów i OB osiągały fizjologiczną normę do D30. Średnie stężenie progesteronu we krwi obwodowej 23 suk efektywnie leczonych suk w dniu podjęcia terapii wynosiło 9,3 ng/ml a w D30 3,6 ng/ml. U jednej suki stężenie progesteronu w dniu podjęcia terapii wynosiło <1 ng/ml (anoestrus). Pomimo tego leczenie okazało się skuteczne. Z 24 skutecznie wyleczonych suk 15 samic zostało unasiennionych podczas I cieczki po leczeniu. Wszystkim tym sukom podczas proestrus/oestrus podawano amoksycylinę o przedłużonym działaniu. Unasiennianie było skuteczne u 10 suk, u 3 nieskuteczne, a u 2 samic zaobserwowano nawrót choroby w fazie dioestrus (kolejna terapia). W kolejnej II cieczce po leczeniu nie zaobserwowano nawrotów w grupie suk skutecznie wcześniej unasiennionych. Z grupy 3 suk unasiennionych wcześniej nieskutecznie, w II cyklu po terapii mioty uzyskano od 2 samic, a u trzeciej wywiązało się po pokryciu ropomacicze. U pozostałych 2 suk obserwowano w II cyklu po terapii kolejny nawrót choroby.

Stosowanie kombinowane antygestagenów, prostaglandyny $F_{2\alpha}$ i środków dopaminergicznych jest efektywną metodą leczenia zapalenia błony śluzowej macicy u suk. Terapia prowadzi w większości przypadków do ustąpienia objawów klinicznych choroby i pozwala na zachowanie płodności samicy.

ROZWÓJ I ZASTOSOWANIE IMPLANTÓW DESLORELINU DO ZAHAMOWANIA PŁODNOŚCI

THE DEVELOPMENT AND USE OF DESLORELIN IMPLANTS TO SUPPRESS FERTILITY

Trigg T¹, Fontaine E.³

¹ PT Consulting Pty Limited, 1 Arthur Street, Balmain 2041, Australia;

² French National veterinary School of Maisons-Alfort.

Nowa, długodziałająca forma agonistów GnRH deslerolin została opisana na konferencji w Norwegii w 2000 roku i uaktualniona podczas konferencji w Brazylii w roku 2004. Od tego czasu obserwujemy równomierny postęp w rozwoju wersji 6- cio miesięcznej, zawierającej 4,7 mg deslerolinu (Suplerolin 6[®] ; S6) ostatnio dopuszczonego do obrotu w krajach europejskich. W Australii i Nowej Zelandii S6 dostępny był od roku 2005 a długodziałający Suprelorin 12[®] (S12), 12-to miesięczna wersja zawierająca 9,4 mg deslerolinu dopuszczony w Australii na 18 miesięcy. Obie konfiguracje były z powodzeniem stosowane w ulotkowych i licznych pozaulotkowych wskazaniach, a dalsze badania i rozwój mają na celu zdobycie dopuszczenia do obrotu w nowych krajach oraz rozszerzenie listy wskazań do zastosowania preparatu. Podjęto serię badań na przeszło 270 psach z zastosowaniem pojedynczej dawki lub powtórzonych dawek w celu antykoncepcji u psów. Dawki wahały się w przedziale od 3 do 12 mg na zwierzę na dawkę i ta sama dawka była powtarzana do 6 razy u 10 psów. Wyniki tych badań były już prezentowane w publikacjach jak również wyniki badań na grupie 145 suk. Stosowanie przy innych wskazaniach były również badane, w tym stosowanie przy opóźnionym dojrzewaniu płciowym, leczeniu hormonozależnych schorzeń takich jak łagodny rozrost gruczołu krokowego czy gruczolak odbytu. W przypadkach nietrzymania moczu zastosowano deslerolin jak również inne preparaty GnRH agonistów. Preparat był również szeroko stosowany w antykoncepcji u wielu gatunków zwierząt nieudomowionych i egzotycznych oraz w leczeniu schorzeń kory nadnerczy u frotek.

Obecna praca stanowi streszczenie dotychczasowych badań i rozwoju produktu podjętych w celu uzyskania zarejestrowanych wskazań dla tej technologii oraz oceni wyniki badań i obserwacji uzyskanych w dalszych pracach nad zastosowaniem preparatu w nowych wskazaniach. Przedstawione zostaną dane o bezpieczeństwie stosowania zawierające wyniki badań laboratoryjnych, badań terenowych jak również doświadczenia ze stosowania w praktykach weterynaryjnych po przeszło 3 latach obecności preparatu na rynku.

STRESZCZENIA PLAKATÓW

POSTER ABSTRACTS

WPLYW WIEKU NA WYMIARY I KSZTAŁT PLEMNİKÓW KNURÓW RASY WIELKIEJ BIAŁEJ POLSKIEJ

EFFECT OF AGE ON DIMENSIONS AND SHAPE OF SPERMATOZOAS OF THE LARGE WHITE BREED BOARS

Dorota Banaszewska, Stanisław Kondracki, Anna Wysokińska

*Akademia Podlaska, Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt,
ul. B. Prusa 14, 08-110 Siedlce
sk@ap.siedlce.pl*

Podjęto próbę oceny wpływu wieku na wymiary i kształt plemników knurów rasy wielkiej białej polskiej.

Badaniami objęto 190 ejakulatów pobranych od 16 knurów rasy wielkiej białej polskiej. Wszystkie knury użytkowane były w dwóch stacjach należących do Mazowieckiego Centrum Hodowli i Rozrodu Zwierząt w Łowiczu. Do badań wybrano knury młode w wieku około 7-8 miesięcy, które jeszcze nie rozpoczęły użytkowania rozplodowego. Przez pierwsze 20 miesięcy użytkowania od każdego knura raz w miesiącu pobierano próbkę ejakulatu do badań morfologii plemników. Z pobranych próbek wykonano preparaty mikroskopowe. Preparaty barwiono metodą bydgoską, a następnie poddano badaniu mikroskopowemu przy użyciu obiektywów immersyjnych, o powiększeniu 100-krotnym z wykorzystaniem mikroskopu NIKON E-400. W każdym preparacie wykonano pomiary morfometryczne piętnastu losowo wybranych plemników widocznych w polu widzenia mikroskopu. Łącznie dokonano 2850 pomiarów plemników. Pomiary morfometryczne obejmowały: obwód główki plemnika, pole powierzchni główki plemnika, długość główki plemnika, szerokość główki plemnika, długość witki i łączną długość plemnika. Pomiary wykonano według metodyki opracowanej przez Kondrackiego i in. (2005)*. Na podstawie wyników pomiarów morfometrycznych obliczono wskaźniki budowy morfologicznej plemnika. Ponadto przeprowadzono ocenę częstości występowania zmian morfologicznych plemników. Na podstawie badania mikroskopowego oceniono 500 plemników, wyszczególniając plemniki wykazujące zmiany główne i podrzędne zgodnie z klasyfikacją Bloma.

Wykazano zależność pomiędzy wiekiem knurów a wymiarami i kształtem plemników. Z wiekiem knurów obserwowano nieznaczny wzrost długości, szerokości oraz pola powierzchni główki plemnika. Plemniki knurów młodych w wieku do 11 miesięcy były jednak nieco dłuższe niż plemniki starszych rozplodników, co potwierdzono zarówno w zakresie długości całego plemnika, jak i w długości samej witki. Stwierdzono również pewną zależność między proporcjami i kształtem plemników, a wiekiem knurów. Plemniki knurów młodych w wieku do około 12 miesięcy zdają się mieć kształt bardziej wydłużony, na co wskazuje nieco mniejszy stosunek długości główki plemnika do długości witki i do łącznej długości plemnika. Ponadto stwierdzono, że wraz z wiekiem knurów zmienia się częstość występowania anomalii morfologicznych plemników. Pod tym względem korzystnie prezentowały się ejakulatory pobierane w młodym wieku, tj. w wieku 8 – 10 miesięcy. W tych ejakulatach stwierdzono około 97% plemników o prawidłowej budowie morfologicznej tj. o około 4,6 - 6,0% więcej niż w nasieniu pobieranym w wieku 26 – 28 miesięcy. W nasieniu pobieranym na początku użytkowania do wieku 12 miesięcy stwierdzono również mniej plemników wykazujących główne zmiany morfologiczne (poniżej 1%).

Z analizy przedstawionych danych wynika, że zarówno wymiary oraz kształt plemników knurów rasy wielkiej białej polskiej zależą od wieku rozplodnika. Wiek knura wpływa również na częstotliwość występowania zmian morfologicznych plemników.

* 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.

WPLYW MROŻENIA NASIENIA KNURA NA PŁODNOŚĆ MACIOR W FERMIE TRZODY CHLEWNEJ

EFFECT OF FROZEN SEMEN ON FERTILITY OF SOWS IN PIGGERY

Wiesław Bielas, Anna Rzaśa, Andrzej Dubiel, Mirosław Koska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt, ul. Pl. Grunwaldzki 49, e-mail: wbie@interia.pl

Celem badań była ocena wpływu inseminacji macior nasieniem mrożonym dwoma metodami w słomkach 0,5 i 5 ml na użytkowość rozrodczą loch i loszek w terenowych warunkach fermowych. Badania przeprowadzono w fermie trzody chlewnej w województwie dolnośląskim na 225 maciorach mieszańcach rasy wbp i pbz (75 lochach wieloródkach, 75 lochach pierwiastkach oraz 75 dojrzałych płciowo loszkach). Samice przydzielono do 15 grup badawczych, po 15 osobników w grupie. Świnie inseminowano nasieniem 6 knurów, w grupach doświadczalnych nasieniem mrożonym, zaś w grupach kontrolnych konserwowanym w stanie płynnym w rozrzedzalniku BTS. Po pobraniu nasienia zakwalifikowany do badań ejakulat dzielono na dwie równe części. Połowę zamrażano wg metody A, zaś pozostałą wg metody B. Nasienie konfekcjonowano w słomki o objętości 5 i 0,5 ml, i po zamrożeniu w parach ciekłego azotu składowano w kontenerach. Lochy wieloródki i pierwiastki inseminowano kateterem do inseminacji poza szyjkowej w 5 dobie po odsadzeniu prosiąt, zaś loszki remontowe w czasie rui potwierdzonej przez knura szukarka. Do każdej porcji nasienia mrożonego, tuż przed inseminacją dodawano 5 mg PGF_{2α}. Przebieg owulacji oraz rozwój ciąży kontrolowano ultrasonograficznie głowicą rektalną oraz abdominalną. Ocenę skuteczności inseminacji oraz użytkowości rozrodczej przeprowadzano na podstawie wskaźnika zapładnialności, oproszeń i ogólnej liczby prosiąt urodzonych w miocie. Obliczenia wykonano przy pomocy programu Statistica 6.0 metodą jednoczynnikowej analizy wariancji w układzie ortogonalnym. Istotność różnic między średnimi oszacowano testem Tukeya lub Duncana. Nasieniem mrożonym w grupach doświadczalnych poddano inseminacji w sumie 180, zaś konserwowanym w stanie płynnym (w grupach kontrolnych) 45 samic. Analizując całościowo wpływ unasienniania 225 svin nasieniem mrożonym i płynnym na wartości wskaźników rozrodu obliczono, że samice inseminowane nasieniem mrożonym demonstrowały, odpowiednio: o 8% niższy wskaźnik zapładnialności (85 do 93%), o 21% niższy wskaźnik oproszeń (70 do 91%) oraz rodziły o 2,5 prosięcia mniej niż lochy inseminowane nasieniem płynnym (8,9 do 11,3). Wskaźnik oproszeń samic w grupach doświadczalnych wynosił 70, zaś w kontrolnych 93,3% ($P \leq 0.05$). Wskaźnik liczebności miotów w grupach samic inseminowanych nasieniem mrożonym wynosił ogółem 8,9, zaś w puli zwierząt inseminowanych nasieniem płynnym 11,3 sztuk, ($P \leq 0.01$). Analiza porównawcza wpływu konfekcjonowania i metodyki kriokonserwacji wykazała nieistotnie statystycznie wyższe wartości wskaźników: oproszeń i liczebności miotów po inseminacji nasieniem mrożonym w słomkach 0,5 ml wg metodyki A we wszystkich grupach wiekowych. Najwyższą jakość rozrodu obserwowano w przedziale wieloródek. Wskaźnik oproszeń i liczebności miotów wieloródek inseminowanych nasieniem mrożonym wyniósł, odpowiednio: 75% i 9,7 prosięcia. Istotnie niższe ($P \leq 0.05$) wartości wymienionych wskaźników uzyskały, odpowiednio: pierwiastki (66% i 8,46) oraz loszki (71% i 8,43 prosięcia w miocie). W grupie zwierząt kontrolnych inseminowanych nasieniem płynnym, również wystąpiła tendencja wyższej płodności i plenności u samic w grupie wiekowej loch wieloródek. W oparciu o ocenę wskaźników użytkowości rozrodczej macior inseminowanych nasieniem konserwowanym w niskich temperaturach, należałoby wskazać na metodę A i sposób konfekcjonowania nasienia przy wykorzystaniu słomek 0,5 ml, jako optymalny sposób kriokonserwacji nasienia knura możliwy do zaakceptowania i pomyślnego zastosowania w fermie trzody chlewnej. Do uzyskania powyższych zachęcających wyników przyczyniło się prawdopodobnie zastosowanie kateterów do inseminacji pozaszyjkowej, dodatek PGF_{2α} do nasienia oraz monitorowanie stanu jajników przy pomocy abdominalnej lub rektalnej głowicy USG.

Grant KBN nr 2P06K 011 26

MEDIATORY STANU ZAPALNEGO INDUKUJĄ APOPTOZĘ W EJAKULOWANYCH LUDZKICH PLEMNIKACH W WARUNKACH IN VITRO

INFLAMMATORY MEDIATORS TRIGGER *IN VITRO* APOPTOSIS IN EJACULATED HUMAN SPERMATOZOA

Monika Frączek¹, Grzegorz Dworacki², Anna Szumała-Kąkol³, Dorota Sanocka¹, Jan Żeromski²,
Maciej Kurpisz¹

¹*Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań; e-mail:*

framon@man.poznan.pl; kurpimac@man.poznan.pl

²*Katedra Immunologii Klinicznej, Zakład Immunologii Instytutu Medycznego w Poznaniu, ul. Rokietnicka 5d, 60-806 Poznań*

³*Pracownia Mikrobiologiczna Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Polna 33, 60-635 Poznań*

Cel pracy: Apoptoza jest naturalnym procesem regulującym liczbę plemników na wszystkich etapach ich rozwoju eliminując plemniki nieprawidłowe. Biorąc pod uwagę fakt, że proces apoptozy może przebiegać na drodze wolnorodnikowej, a proces zapalny nierozdzielnie związany jest z aktywacją metabolizmu tlenowego i wzrostem uwalniania reaktywnych form tlenu (RFT), interesującym wydaje się przeanalizowanie wpływu poszczególnych mediatorów stanu zapalnego nasienia na proces apoptozy *in vitro* w różnych subpopulacjach męskich komórek rozrodczych.

Materiał i metody: Materiał badawczy stanowiło nasienie od 10 zdrowych ochotników z prawidłowym spermogramem oraz krew żylna, pobrana na heparynę od 10 zdrowych dawców krwi. Leukocyty izolowano z pełnej krwi na gradiencie Histopaque-1,077. Plemniki izolowano z nasienia techniką wypływania (frakcja swim-up) oraz metodą wirowania na nieciągłym gradiencie perkolu (frakcja 90% i 47%). Do badań wybrano także dwie kombinacje cytokin prozapalnych (IL-6+IL-8 oraz IL-12+IL-18) oraz dwa szczepy bakteryjne (*Escherichia coli* oraz *Bacteroides ureolyticus*). Proces apoptozy w plemnikach badano przy użyciu dwóch różnych zestawów testów firmy R&D Systems: metodą elektroforezy pojedynczych komórek w żelu (*comet assay*) oraz metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem barwienia TUNEL. Ponadto wyznakowane plemniki obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym w celu morfologicznego potwierdzenia apoptozy.

Wyniki: Przy braku obecności mediatorów stanu zapalnego, plemniki o najlepszej seminologii wykazywały najmniejszy odsetek komórek TUNEL-pozytywnych i najkrótsze długości komet, natomiast najwyższy odsetek komórek z pofragmentowanym DNA, którym jednocześnie odpowiadały najdłuższe długości komet stwierdzano we frakcji plemników o najgorszych parametrach seminologicznych (frakcja 47% perkolu). Inkubacja plemników z cytokinami prozapalnymi znacząco wpływała na wzrost poziomu fluorescencji (MFI) populacji TUNEL-pozytywnej w stosunku do plemników bez inkubacji z mediatorami zapalnymi ($p < 0.01$ dla frakcji swim-up po inkubacji z IL-6+IL-8 i $p < 0.05$ dla frakcji 90% perkolu po inkubacji z IL-12+IL-18). Obecność szczepów bakteryjnych wiązała się z dużym wzrostem zarówno odsetka populacji pozytywnej, jak i intensywności fragmentacji DNA. Spośród dwóch wybranych szczepów bakteryjnych, większy wpływ na apoptozę miały bakterie beztlenowe w odniesieniu do plemników uzyskanych w 90% gradiencie perkolu i w tym przypadku indeks apoptotyczny osiągnął najwyższy poziom ($p < 0.05$). Dodatkowo, analiza plemników w mikroskopie fluorescencyjnym, poza obrazami charakterystycznymi dla apoptotycznie zmienionych komórek TUNEL-pozytywnych wykazała także obecność plemników z silniejszą fluorescencją w obrębie wstawki.

Wnioski: Z przeprowadzonych badań jednoznacznie wynika, że mediatory stanu zapalnego w warunkach *in vitro* nasilają procesy apoptotyczne w ejakulowanych plemnikach. Zasadniczą rolę w tym względzie należy przypisać czynnikowi infekcyjnemu. Uzyskane wyniki stanowią dowód na indukcję apoptozy w ejakulowanych plemnikach, w wyniku ich bezpośredniego kontaktu z bakteriami lub ich toksynami, nawet bez pośrednictwa reaktywnych pochodnych tlenu. Z kolei cytokiny prozapalne przede wszystkim nasilają powstawanie dodatkowych pęknięć DNA w komórkach z wcześniej zainicjowaną apoptozą. Bardzo ważną z praktycznego punktu widzenia jest obserwacja najwyższej liczby komórek apoptotycznych po inkubacji z mediatorami zapalnymi w subpopulacji plemników uzyskanych z 90% gradientu perkolu. W świetle tych danych, selekcja plemników na gradiencie perkolu nie powinna być zalecaną metodą do pozyskiwania plemników do celów zapłodnienia pozaustrojowego. Wyniki analizy obrazowej potwierdzają zwiększoną wrażliwość mitochondrialnego DNA na uszkodzenia oksydacyjne, co może być przyczyną szybszego kierowania ejakulowanych plemników na drogę apoptozy.

INTERAKCJA FRAKCJI LIPOPROTEIN IZOLOWANYCH Z ŻÓŁTKA JAJA Z RECEPTORAMI PLAZMOLEMY PLEMNİKÓW KNURA - BADANIA FLUORESCENCYJNE

INTERACTION OF LIPOPROTEIN FRACTIONS ISOLATED FROM EGG YOLK WITH RECEPTORS OF BOAR SPERM PLASMA MEMBRANE – FLUORESCENT STUDIES

Leyland Fraser, Łukasz Zasiadczyk, Jerzy Strzeżek

*Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, ul. Oczapowskiego 5, 10-718
Olsztyn-Kortowo, e-mail: kbz@uwm.edu.pl*

Fluorochrom ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid) zastosowano do badań nad mechanizmem stabilizacji plazmolemy plemników knura przez frakcję lipoprotein izolowaną z żółtka jaja strusia afrykańskiego (LPFo), stanowiącą składnik rozcieńczalnika Kortowo 3 (K-3) do konserwacji nasienia w różnych temperaturach.

Pełne ejakulatory, kolekcjonowane od 3 knurów, po rozrzedzeniu rozcieńczalnikiem K-3 zawierającym zróżnicowane stężenia kompleksu LPFo-ANS (0,5%; 2%; 5%) inkubowano 3 godz. w temperaturze 16°C. Analizowano wpływ LPFo-ANS na stabilność plazmolemy plemników z uwzględnieniem źródła plemników (pełny ejakulat; gęsta frakcja), oraz plemników poddanych działaniu udaru chłodowego (1 godz. w 4°C) lub ciśnienia hypoosmotycznego (HOS; 150 mOsm). Stopień wiązania LPFo-ANS z receptorami plazmolemy klasyfikowano na podstawie intensywności fluorescencji w różnych regionach plemników. Jednocześnie prowadzono ocenę ruchliwości plemników; integralności ich plazmolemy (SYBR-14/PI) oraz funkcjonalności mitochondriów (R 123/PI).

Stwierdzono, że odsetek plemników wykazujących fluorescencję zarówno w regionie główki jak i wstawki był wyższy ($p < 0,05$) w wariancie rozcieńczalnika K-3 z dodatkiem LPFo w stężeniu 2% i 5% aniżeli 0,5%. Inkubacja plemników 3 godz. w temperaturze 16°C nasilała fluorescencję LPFo-ANS w omawianych regionach plemników. Zjawisko to nie powodowało istotnych zmian ruchliwości plemników, integralności plazmolemy oraz funkcjonalności mitochondriów. Udar chłodowy plemników i warunki ciśnienia hypoosmotycznego w sposób drastyczny redukowały intensywność fluorescencji ANS-LPFo w porównaniu do prób kontrolnych plemników.

Rezultaty badań wskazują, że preparat LPFo wykazuje silne działanie osłonowe wobec różnych regionów plazmolemy plemników. Dodatek 2% lub 5% LPFo do rozcieńczalnika K-3 może być wykorzystywany w praktyce konserwacji nasienia knura.

Praca wykonana w ramach tematu badań własnych 0103.0206 UWM w Olsztynie

USZKODZENIE MATERIAŁU GENETYCZNEGO W PLEMNIKACH W WYNIKU STANU ZAPALNEGO PODCZAS INFЕКCJI W MĘSKIM UKŁADZIE MOCZOWO-PŁCIOWYM

SPERM GENETIC MATERIAL DAMAGE CAUSED BY INFLAMMATORY PROCESS IN MALE GENITO-URINARY TRACT INFECTION

Katarzyna Gulczyńska¹, Dorota Sanocka¹, Maciej Kurpisz¹

Instytut Genetyki Człowieka PAN; ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań, kurpimac@man.poznan.pl

Cel pracy: Integralność chromatyny plemników jest nieodzowna dla przekazania ojcowskiej informacji genetycznej, a od struktury chromatyny jest uzależniona zdolność zapładniająca plemników oraz prawidłowy rozwój zarodków. Rutynowa analiza nasienia, określająca stężenie plemników w nasieniu, ich ruchliwość i morfologię, nie identyfikuje nieprawidłowości struktury chromatyny plemników, w związku z czym, nie może być stosowana jako wiarygodny test w prognostyce płodności. Stan zapalny w męskim układzie moczowo-płciowym jest powszechnym czynnikiem, dodatkowo obniżającym zdolność zapładniającą plemników. Stres oksydacyjny i niewydolność systemu antyoksydacyjnego w nasieniu są nieodłącznymi konsekwencjami stanu zapalnego w męskim układzie moczowo-płciowym. Brak równowagi pomiędzy substancjami pro- i antyoksydacyjnymi prowadzi zazwyczaj do peroksydacji struktur błonowych plemników oraz upośledzenia funkcji białek, a także fragmentacji DNA. Celem pracy było określenie integralności chromatyny plemników w warunkach stresu oksydacyjnego w układzie *in-vivo*, u mężczyzn ze stanem zapalnym w układzie moczowo-płciowym, oraz wpływu fragmentacji DNA na jakość nasienia.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły ejakulatory 15 mężczyzn ze zdiagnozowanym stanem zapalnym w układzie moczowo-płciowym, oraz 15 zdrowych dawców, w wieku 20-35 lat. Wykonano analizę seminologiczną wszystkich prób, obejmującą ocenę objętości i pH ejakulatu, koncentracji plemników, ich ruchliwości oraz żywotności. Morfologię plemników oceniano na utrwalonych rozmazach cytologicznych barwionych według Papanicolaou. Przeprowadzono ocenę liczby leukocytów w nasieniu przy zastosowaniu barwienia peroksydazowego według Endtza, oraz analizę bakteriologiczną przy użyciu kitów komercyjnych. Stopień fragmentacji materiału genetycznego plemników badano z zastosowaniem testu Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA).

Wyniki: Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, iż w warunkach stresu oksydacyjnego w stanach zapalnych w męskim układzie moczowo-płciowym, dochodzi do statystycznie istotnego pofragmentowania materiału genetycznego plemników ($p < 0,001$), a także do obniżenia odsetka plemników o ruchu postępującym (A+B) ($p < 0,001$). Z naszych badań wynika, iż uszkodzenie DNA plemnikowego prawdopodobnie nie wpływa na objętość nasienia, ani na koncentrację i morfologię plemników. Stwierdzono istotną korelację stopnia fragmentacji DNA z liczbą leukocytów w nasieniu ($p < 0,001$).

Wnioski: Podczas reakcji zapalnej dochodzi do uszkodzenia materiału genetycznego plemników, prawdopodobnie spowodowanego nadprodukcją reaktywnych form tlenu. Głównym źródłem reaktywnych form tlenu w nasieniu pacjentów ze stanem zapalnym w układzie moczowo-płciowym wydają się być zaktywowane leukocyty. W wyniku uszkodzeń oksydacyjnych spada jakość nasienia, jednakże w rutynowej analizie seminologicznej widoczna jedynie jako spadek ruchliwości plemników. SCSA w połączeniu ze standardową analizą nasienia dostarcza pełniejszej informacji o jakości ejakulatu w stanach zapalnych w męskim układzie moczowo-płciowym, dlatego wydaje się być użytecznym narzędziem w pogłębionej diagnostyce i prognozowaniu powodzenia rozrodu.

WPLYW DEFICYTU DHT NA IMMUNOLOKALIZACJĘ BCL-X – BIAŁKA REGULUJĄCEGO PROCES APOPTOZY W NABŁONKU PLEMNIKOTWÓRCZYM SZCZURÓW

INFLUENCE OF DHT-DEFICIENCY ON IMMUNO EXPRESSION BCL-X – ONE OF APOPTOSIS REGULATOR IN SEMINIFEROUS EPITHELIUM OF RATS

Agnieszka Kolasa¹, Fabian Urban¹, Mariola Marchlewicz¹, Lidia Wenda-Różewicka¹,
Barbara Wiszniewska¹

¹Zakład Histologii i Embriologii, Pomorska Akademia Medyczna,
al. Powstańców Wlkp. 72 70-111 Szczecin, e-mail: AK1712@sci.pam.szczecin.pl

CEL PRACY

Apoptoza jest ewolucyjnie konserwatywnym procesem programowanej śmierci komórek, który odgrywa kluczową rolę podczas rozwoju, a następnie w utrzymaniu prawidłowej homeostazy tkanek, jak i podczas patogenezy wielu procesów degeneracyjnych. Proces ten jest również nieodzowny dla przebiegu prawidłowej i wydajnej zarazem spermatogenezy. Komórki germinalne nabłonka plemnikotwórczego podejmują samobójczą śmierć w warunkach fizjologicznych spontanicznie, bądź w odpowiedzi na działanie różnorodnych niekorzystnych czynników. Wykazano, że niedobór gonadotropin, a następnie androgenów wzmacnia ten proces na terenie gonady.

Lokalnie produkowany przez komórki Leydiga testosteron (T) jest konwertowany do biologicznie aktywniejszego dihydrosteronu (DHT) przy udziale 5α -reduktazy typu 2 (5α -red2), uważanej za izoformę preferencyjnie działającą w męskim układzie płciowym. DHT, obok testosteronu reguluje morfologię i fizjologię nabłonka plemnikotwórczego. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że deficyt DHT prowadzi między innymi do zaburzenia morfologii i funkcji nabłonka plemnikotwórczego, manifestującego się przedwczesnym złuszczeniem niedojrzałych komórek spermatogenicznych do światła kanalików krętych.

Celem pracy było zatem ustalenie czy degeneracja nabłonka plemnikotwórczego w warunkach deficytu DHT była wynikiem nasilonej apoptozy komórek. Do realizacji wyznaczonego celu analizowano ekspresję Bcl-x, markerowego białka związanego z błoną mitochondrialną, regulującego proces apoptozy.

MATERIAŁ I METODA

Dojrzałe płciowo samce szczurów szczepu Wistar podzielono losowo na 3 grupy (n=5 każda): kontrolną (K) i dwie doświadczalne (Fin28, Fin56). Szczurom grup doświadczalnych podawano *per os* finasteryd – steroidowy inhibitor 5α -red2 (Proscar[®], MSD Szwecja) przez 28 dni (czas dwóch cykli nabłonka plemnikotwórczego) i 56 dni (czas przebiegu jednej spermatogenezy) w dawce 5 mg/kg masy ciała. Na histologicznych skrawkach jąder szczurów wykonano reakcję immunohistchemiczną (IHC). Skrawki inkubowano 60 min. z mysim monoklonalnym przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko Bcl-x (4µg/ml) (Bcl-x antibody, clone 2H12; GeneTex Inc.). Kolejne etapy immunoreakcji przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta dołączoną do zestawu EnVision⁺System-HRP (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), wizualizującego miejsce wiązania przeciwciała z antygenem reakcją kompleksu avidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa z diaminobenzydyną jako chromogen. Preparaty dodatkowo podbarwiono hematoksyliną i oglądano w mikroskopie świetlnym (Axioskop Zeiss, Niemcy). Dla sprawdzenia specyficzności wiązania przeciwciała pierwszorzędowego, wykonano równorzędnie reakcję z pominięciem tego przeciwciała. Jako pozytywny wynik reakcji uznano brązowy odczyn cytoplazmy.

WYNIKI

Ekspresję Bcl-x zaobserwowano w cytoplazmie komórek plemnikotwórczych zwierząt wszystkich badanych grup. U szczurów kontrolnych (K) tylko pojedyncze spermatogonia i nieliczne spermatocyty I rzędu były immunododatnie. Wzór immunolokalizacji Bcl-x u szczurów otrzymujących finasteryd przez 28 dni (Fin28) był podobny do uzyskanego u zwierząt kontrolnych, ale ilościowo i jakościowo intensywniejszy. Zdecydowanie wyższą immunoekspresję badanego markera apoptozy obserwowano w nabłonku plemnikotwórczym zwierząt z deficytem DHT trwającym czas jednej spermatogenezy

(Fin56). W tej grupie szczurów Bcl-x-pozytywne były zarówno komórki szlaku spermatogenezy zlokalizowane w bazalnym przedziale nabłonka plemnikotwórczego, jak i spermatocyty I rzędu przedwcześnie złuszczone do światła kanalików. Dodatkowo w grupie Fin56 występowały sporadycznie kanaliki kręte, ujawniające degenerację nabłonka plemnikotwórczego. W tych kanalikach bardzo intensywną immunoekspresję Bcl-x wykazywała cytoplazma komórek wielojądrzastych, prawdopodobnie wywodzących się okrągłych spermatyd.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki sugerują, że ekspresja Bcl-x może być zależna od aktualnego stanu hormonalnego, panującego na terenie gonady. Pogłębiający się deficyt DHT prowadzi do nadekspresji Bcl-x – białkowego regulatora apoptozy, manifestującej się przedwczesnym złuszczeniem niedojrzałych komórek szlaku spermatogenezy do światła kanalików krętych. Zatem przejawem dysfunkcji gonady w warunkach niedoboru DHT jest nasilony proces samobójczej śmierci komórek gametogenicznych, mogący prowadzić do znacznego obniżenia płodności.

CZY γ -GLUTAMYLOTRANSPEPTYDAZA (γ -GT) MOŻE WSPOMAGAĆ ANTYOKSYDACYJNY SYSTEM NASIENIA KNURA?

DOES γ -GLUTAMYLOTRANSPEPTIDASE SUPPORT THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF BOAR SEMEN?

Magdalena Koziorowska-Gilun¹, Marek Koziorowski², Jerzy Strzeżek¹

¹Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn-Kortowo, e-mail: kbz@uwm.edu.pl

²Zakład Fizjologii i Rozrodu Zwierząt, Zamiejscowy Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski, Kolbuszowa, e-mail: m.kozioro@univ.rzeszow.pl

Plemniki knura ze względu na wysoką zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w plazmolemie są wyjątkowo podatne na uszkodzenia oksydacyjne spowodowane reaktywnymi formami tlenu (RFT). Enzymatyczne i nieenzymatyczne systemy antyoksydacyjne chronią plemniki przed działaniem RFT. Funkcja L-glutationu, jako węzłowego niskocząteczkowego związku antyoksydacyjnego, związana jest z aktywnością kilku enzymów. γ -GT jest enzymem biorącym udział w metabolizmie L-glutationu. Przypisuje się jej również rolę w ochronie plemników przed RFT (1). Stanowić to może istotną przesłankę o udziale γ -GT w systemie antyoksydacyjnym nasienia knura.

Celem badań było określenie aktywności γ -GT w płynach sekrecyjnych układu rozrodczego knura.

Do badań wykorzystano ejakulatory pozyskiwane metodą manualną. Próby wirowano przez 10 min. przy 9000 x g, a uzyskane supernatanty przeznaczano do analiz. Płyn ogona najądrza pozyskiwano przyżyciowo, metodą chirurgiczną poprzez punkcję kanalików ogona najądrza. Natomiast płyn gruczołów pęcherzykowych po przeprowadzeniu zabiegu laparotomii, a następnie punkcję gruczołów. Płyny dodatkowych gruczołów płciowych wirowano 15 min. przy 9000 x g a następnie przeznaczano do analiz. Aktywność γ -GT w analizowanych płynach oznaczano przy użyciu zestawu diagnostycznego Liquick Cor-GGT-Cormay (Poland).

Najwyższą aktywność γ -GT wykazano w płynie ogona najądrza ($1028,20 \pm 25,5 \mu\text{kat/l}$), najniższą zaś w płynie gruczołów pęcherzykowych ($29,93 \pm 0,7 \mu\text{kat/l}$). W przypadku plazmy nasienia aktywność wynosiła $99,08 \pm 2,7 \mu\text{kat/l}$.

Stwierdzona wysoka aktywność γ -GT w płynie ogona najądrza, potwierdza nadrzędną rolę tego gruczołu w ochronie dojrzewających i magazynowanych w nim plemników przed atakiem RFT.

Literatura:

Zalata A. i wsp., 1995. Relationship between resazurin reduction test, reactive oxygen species generation, and γ -glutamyltransferase. Hum. Reprod. 10: 1136-1140.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego promotorskiego Nr N N311 1686 33

WPLYW SKŁADU ROZTWORU HYPOOSMOTYCZNEGO NA OCENĘ INTEGRALNOŚCI BŁONY PLEMNİKÓW TRYKA PODDANYCH KRIOKONSERWACJI

INFLUENCE OF CONTENT OF HYPOOSMOTIC SOLUTION ON PLASMOLEMA INTEGRITY ESTIMATION OF RAM SPERMATOZOA AFTER CRIOPRESERVATION

Maciej Murawski, Dorota Semrau

*Uniwersytet Rolniczy, Katedra Hodowli Owiec i Kóz, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków,
rzmmuraw@cyf-kr.edu.pl*

Cel pracy: Podczas procesu zamrażania i rozmrażania integralność błony cytoplazmatycznej plemników tryka może ulec naruszeniu lub trwałemu uszkodzeniu, co obniża ich żywotność lub czyni je nieprzydatnymi do zapłodnienia. Brak ruchliwości plemników nie zawsze jest równoznaczny z brakiem integralności ich błony komórkowej, dlatego iż część z nich może mieć w pełni zachowaną plazmolemmę. Identyfikację takich subpopulacji plemników można dokonać za pomocą testu HOS. Użyteczność metody hypoosmotycznej wymaga jednak dobrania odpowiedniego składu roztworu hypoosmotycznego oraz czasu inkubacji i porównania jej z wynikami ocen innych analiz nasienia. Dlatego celem przeprowadzonych badań było porównanie wpływu składu roztworów hypoosmotycznych na ocenę integralności błony cytoplazmatycznej plemników tryka po rozmrożeniu.

Materiał i metody: Do przeprowadzonych badań posłużyło 18 ejakulatów od 6 tryków. Po ocenie makro i mikroskopowej zakwalifikowane ejakulatory mrożono w słomkach o pojemności 0,25 ml w ciekłym azocie metodą dwustopniową w rozrzedzalniku mlekowo-żółtkowo-fruktozowym z 7% zawartością glicerolu. Po rozmrożeniu nasienie inkubowano w łaźni wodnej o temp. 37 °C przez 10 min. a następnie oceniano ruch postępowy plemników. Ocenę integralności błony komórkowej plemników przeprowadzono metodą hypoosmotyczną. Do oceny integralności plazmolemmy plemników sporządzono trzy roztwory hypoosmotyczne (HOS) o osmolalności 100 mOsm o następującym składzie: cytrynian sodu (40mg) i fruktoza (75mg) –HOS1, cytrynian sodu (42mg) i glukoza (87mg) –HOS2 oraz HOS3 –cytrynian sodu (75mg). Ocenę nasienia w poszczególnych roztworach przeprowadzono dodając 50µl rozmrożonego nasienia do 1ml każdego z trzech roztworów HOS a po 10 min. inkubacji w łaźni wodnej, pod mikroskopem oceniano stan integralności błony plemników na podstawie odkształceń wstki i wstawki.

Wyniki: Średnio najwięcej plemników na poziomie 82,5% z integralną błoną cytoplazmatyczną zaobserwowano u wszystkich trzech badanych tryków w roztworze HOS3. Natomiast średnio najmniej plemników tj. 76% z nieuszkodzoną plazmolemmą stwierdzono wykonując test w roztworze z cytrynianem sodu i glukozą (HOS2). Stwierdzone różnice są statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$). Nie stwierdzono różnic w ocenie integralności plazmolemmy plemników ocenianych w roztworach HOS1 i HOS3, jednakże wyższą wartość oceny integralności błony cytoplazmatycznej wyrażoną w % zawsze obserwowano w roztworze hypoosmotycznym wykonanym tylko z cytrynianu sodu (HOS3).

Wnioski: Skład roztworu hypoosmotycznego do oceny integralności plazmolemmy plemników tryka ma istotny wpływ na jej wynik. Składniki roztworu HOS w sposób istotny wykazują interakcję z plazmolemmą plemnika wpływając na jej integralność.

TOPOLOGIA CHROMOSOMÓW 15, 18, X I Y W JĄDRZE KOMÓRKOWYM PLEMNIKA U NIEPŁODNYCH MĘŻCZYZN Z PODWYŻSZONYM POZIOMEM ANEUPLOIDII

TOPOLOGY OF CHROMOSOMES 15, 18, X AND Y IN SPERM CELL NUCLEI OF INFERTILE PATIENTS WITH INCREASED LEVEL OF ANEUPLOIDY

Marta Olszewska¹, Ewa Wiland¹, Maciej Kurpisz¹

¹ Instytut Genetyki Człowieka, Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
e-mail: martaze@man.poznan.pl; ewila@man.poznan.pl; kurpimac@man.poznan.pl

Jądro komórkowe, zarówno komórki diploidalnej jak i haploidalnej, stanowi wysoce skompartmentalizowaną strukturę, w której chromosomy zajmują ściśle określone miejsca – terytoria chromosomowe (CT), które wraz z przestrzeniami międzychromosomowymi (IC), macierzą jądrową oraz nukleoplazmą, tworzą architekturę wewnątrzjądrową. Wewnątrz jądra komórkowego plemnika obserwuje się ponadto występowanie unikatowego dla plemników obszaru chromocentrum, utworzonego przez zgrupowane centromery chromosomów. Jednocześnie telomery identyfikowane na peryferium jądra komórkowego wykazują tendencję do formowania dimerów i tetramerów.

Celem badań było sprawdzenie, czy podwyższony poziom aneuploidii chromosomów plemnikowych może stanowić czynnik zakłócający lokalizację centromerów chromosomów 15, 18, X i Y u mężczyzn z niepowodzeniami rozrodu.

Za pomocą techniki FISH analizowano lokalizację liniową (odsetek sygnałów fluorescencyjnych w każdym z trzech wyodrębnionych obszarów jądra komórkowego) oraz radialną (przestrzenna pozycja centromeru, tj. w głębi lub bliżej błony jądra komórkowego) centromerów wybranych chromosomów. Pozycję centromerów analizowano u 4 mężczyzn z grupy kontrolnej oraz u 5 pacjentów z niepowodzeniami rozrodu wykazujących podwyższony poziom aneuploidii.

Stwierdzono, że w grupie osobników kontrolnych centromery wybranych chromosomów zajmowały niewielki obszar stanowiący fragment chromocentrum. Zaś wyniki uzyskane dla grupy pacjentów wskazują na zmiany w lokalizacji obszaru zajmowanego przez centromery chromosomów 15, 18, X i Y w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto w plemnikach z disomią (n+1) lokalizacja liniowa centromerów chromosomów była przesunięta: chromosomy 15,15 oraz Y,Y w kierunku części centralnej jądra komórkowego plemnika, natomiast 18,18 w kierunku witki. W przypadku chromosomu X takich zmian nie zaobserwowano.

SEZONOWE ZMIANY AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZY 3 BETA-HYDROKSYSTEROIDOWEJ W JĄDRACH GĄSIORÓW

THE SEASONAL CHANGES OF 3 BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE ACTIVITY IN GANDER TESTIS

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

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

Hormony steroidowe pełnią istotną rolę we wzroście, rozwoju i funkcjonowaniu większości tkanek u kręgowców. Enzymem kluczowym w przebiegu głównych szlaków biosyntezy steroidów jest dehydrogenaza 3beta-hydroksysteroidowa/delta5-delta4 izomeraza (3beta-HSD). Jest to enzym związany z błonami wewnątrzkomórkowymi i zależny od NAD. Przeprowadza oksydację i izomeryzację delta5 3beta-hydroksysteroidów do delta4 ketosteroidów. Uczestniczy w syntezie wszystkich klas hormonów steroidowych: glikokortykoidów, mineralokortykoidów, progesteronu, estrogenów i androgenów. W jądrach ssaków 3beta-HSD jest zlokalizowana przede wszystkim w siateczce endoplazmatycznej gładkiej komórek Leydiga (śródmiaższowych), gdzie katalizuje powstawanie androstendionu i testosteronu. U ptaków, podobnie jak u ssaków, jądra są miejscem sekrecji androgenów. Niewiele jednak wiadomo nie tylko o wewnątrzkomórkowej lokalizacji 3beta-HSD ale też o zmianach jej aktywności związanych z sezonem rozrodczym.

Celem doświadczenia było zbadanie sezonowych zmian aktywności 3beta-HSD w gonadzie męskiej gąsiorów gęsi domowej.

Jądra użyte do badań pochodziły od dojrzałych płciowo samców gęsi białej włoskiej odmiany kołudzkiej. Gonady pobierano w szczycie sezonu rozplodowego (marzec) oraz podczas braku aktywności rozrodczej (lipiec). Tkanę zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w ultrazamrażarce. Jądra cięto przy użyciu kriostatu na skrawki, które inkubowano przez 4 godziny (37°C) w buforze (pH=7,2) zawierającym substraty: pregnenolon (powstawanie progesteronu) lub dehydroepiandrosteron (konwersja w androstendion), koenzym NAD oraz sól tetrazolową (reakcja barwna). Po zakończonej reakcji histochemicznej skrawki płukano w buforze fosforanowym, utrwalano w 4% formalinie i zatapiano w glicero-żelu. Miejsca aktywności 3beta-HSD wyznaczały ciemnoniebieskie ziarna formazanu, powstałego z soli tetrazolowej na skutek redukcji NAD. Aktywność enzymu określano na podstawie procentowej zawartości ziaren formazanu w stosunku do obszaru gdzie reakcja nie zachodziła, zmierzonej przy użyciu komputerowego systemu do analizy obrazu. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Zaobserwowano istotnie wyższą aktywność 3beta-HSD w preparatach z jąder gąsiorów będących w szczycie sezonu rozplodowego w porównaniu do skrawków pochodzących od gąsiorów z okresu braku aktywności rozrodczej. Różnice te występowały zarówno po zastosowaniu pregnenolonu jak i dehydroepiandrosteronu jako substratu dla badanego enzymu.

Otrzymane wyniki wykazały, że aktywność 3beta-HSD obniża się w okresie poza sezonem rozrodczym co sugeruje sezonowe zmiany w procesie steroidogenezy jądrowej u gąsiorów.

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

WPŁYW KONSERWACJI NASIENIA KNURA NA RUCHLIWOŚĆ, POZIOM ATP I INDUKOWANĄ EMISJĘ FOTONOWĄ PLEMNİKÓW

INFLUENCE OF PRESERVATION OF BOAR SEMEN ON MOTILITY, ENERGETIC CONDITION AND PHOTON EMISSION OF SPERMATOZOA

Piotr Gogol, Agnieszka Wierchoś-Hilczer, Barbara Szczęśniak-Fabiańczyk

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki-PIB, 32-083 Balice-Kraków, Polska
pgogol@izoo.krakow.pl

Celem pracy było zbadanie zmian poziomu ATP, ruchliwości i indukowanej emisji fotonowej (jako wskaźnika peroksydacji lipidów) plemników knura w trakcie siedmiodniowego przechowywania nasienia. Pozwoliłyby to określić przydatność nasienia do inseminacji po dłuższym niż stosowany w praktyce 3-5 dniowy okres przechowywania.

Badania prowadzono na nasieniu pochodzącym od 5 knurów (1 knur rasy pbz i po 2 knury rasy wbp oraz krzyżówki pietrain x duroc). Od każdego knura pobierano od 4 do 5 ejakulatów. Po pobraniu, oddzieleniu części galaretowatej oraz ocenie ruchliwości i koncentracji nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikiem BTS do koncentracji 30×10^6 plemników w 1 ml i umieszczano w temperaturze 15 °C. Następnego dnia oraz po 4 i 7 dniach przechowywania nasienie poddawano ocenie ruchliwości, poziomu ATP i emisji fotonowej. Ocenę ruchliwości przeprowadzano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym po 30 minutowej inkubacji próbek nasienia w temperaturze 37 °C. Indukowaną emisję fotonową z plemników mierzono w luminometrze AutoLumat LB953 wyposażonym w chłodzony fotopowielacz o zakresie czułości spektralnej 370-620nm. Przed pomiarem plemniki przepłukiwano 0,9% roztworem NaCl i dwukrotnie wirowano (700 g, 15 minut), celem usunięcia osocza i rozcieńczalnika po czym rozrzedzano 0,9% roztworem NaCl do koncentracji 200×10^6 plemników w 1 ml. Następnie do próbki o objętości 500 µl, dodawano 10 µl 5mM roztworu luminolu – związku chemicznego stosowanego jako wzmacniacz luminescencji. Pomiaru emisji dokonywano w temperaturze 20 °C bezpośrednio po dodaniu 100 µl 0,3 mM roztworu FeSO₄. Poziom ATP w plemnikach określano metodą bioluminescencyjną przy wykorzystaniu zestawu ATP lite 1step (PerkinElmer).

Ruchliwość plemników po 1 dniu przechowywania wynosiła średnio 56,46% i obniżała się istotnie ($p \leq 0,01$) w trakcie przechowywania do 49,17 % po 4 dniach i 46,04 % po 7 dniach. Spadkowi ruchliwości plemników towarzyszył istotny spadek poziomu ATP ($p \leq 0,01$). Po 4 dniach przechowywania poziom ATP obniżył się do 71,44%, a po 7 dniach do 63,52% w stosunku do poziomu ATP zmierzonego po 1 dniu przechowywania. Natomiast natężenie emisji fotonowej istotnie wzrosło w trakcie przechowywania ($p \leq 0,01$). Po 1 dniu natężenie emisji wynosiło średnio 13,78 zliczeń fotonów $\times 10^5/450s$, a następnie wzrastało do poziomu 17,37 i 19,31 odpowiednio po 4 i 7 dniach przechowywania.

Uzyskane wyniki wskazują, że reaktywne formy tlenu i produkty peroksydacji lipidów błon komórkowych mają niekorzystny wpływ na poziom ATP i ruchliwość plemników. Badanie indukowanej luminescencji w połączeniu z oceną ATP i ruchliwości może dostarczyć dodatkowych informacji o stanie funkcjonalnym plemników i przydatności nasienia do inseminacji.

CHARAKTERYSTYKA OPIOIDOPODOBNYCH PEPTYDÓW W NASIENIU OGIERÓW

CHARACTERISTIC OF OPIOID-LIKE PEPTIDES IN THE STALLION SEMEN

Krystyna Pierzchała-Koziec¹, Joanna Zubel¹, Kazimierz Kosiniak-Kamysz²,
Zenon Podstawski²

*Katedra Fizjologii Zwierząt¹, Katedra Hodowli Koni², Uniwersytet Rolniczy, Al. Mickiewicza 24/28, Kraków,
e-mail: rk koziec@cyf-kr.edu.pl*

Proces aktywacji plemników wymaga wielu biochemicznych przemian wśród, których kanały wapniowe pełnią istotną funkcję. Najnowsze badania wykazały udział endogennych peptydów opioidowych w obrocie wapnia i modyfikacji kanałów wapniowych. Stwierdzono obecność receptorów opioidowych typu mi w plemnikach ogierów, których zablokowanie dużymi dawkami naloksonu, spowodowało zredukowanie ruchu postępowego. Z drugiej strony, wykazano także, że małe dawki naloksonu, działającego jako antagonist receptorów opioidowych, zwiększyły ruch postępowy plemników. Jednak obecność receptorów opioidowych w błonie komórkowej plemników nie zawsze świadczy o syntezie, magazynowaniu i/lub sekrecji specyficznych dla nich peptydów.

Dlatego też celem eksperymentu było wykazanie obecności wolnych i związanych (prekursorowych) form Met-enkefaliny, najważniejszego peptydu rodziny enkefalin w nasieniu ogierów.

Materiał i Metody. Doświadczenie przeprowadzono na nasieniu pobranym od 10 ogierów ze stadniny w Bogusławicach w kwietniu 2007 roku. Natychmiast po pobraniu przeprowadzono rutynową ocenę jakości nasienia. Celem podziału na frakcje, nasienie wirowano przez 10 minut przy 200xg, w temperaturze 4°C, następnie osocze i osad plemników zamrożono w -20°C aż do wykonania analiz. Uwolnienie aktywnych fizjologicznie pięcioaminokwasowych cząsteczek Met-enkefaliny z jej prekursorów wykonano przy zastosowaniu hydrolizy enzymatycznej używając trypsyny i karboksypeptydazy B. Oznaczenie stężenia wolnej i związanej formy Met-enkefaliny wykonano w pełnym nasieniu, jego osoczu oraz plemnikach metodą radioimmunologiczną po wcześniejszej ekstrakcji peptydów. Ekstrakcję opioidów przeprowadzono przy użyciu kolumn chromatograficznych wypełnionych Porapakem Q oraz absolutnego alkoholu etylowego. Próbkę poddano całodobowej liofilizacji próżniowej i natychmiast skierowano do analizy traktując oczyszczoną enkefalinę przeciwciałem oraz znakowaną ¹²⁵J-Met-enkefaliną.

Wyniki . Rutynowa ocena nasienia wykazała, że wszystkie badane ogiery miały prawidłowe nasienie charakteryzujące się koncentracją plemników od 195x10⁶ do 425x10⁶ w 1 ml, ich ruchliwością w zakresie 2/70 do 4/90 i prawidłową morfologią w granicach od 76,3 do 92,5%. Stężenie wolnej Met-enkefaliny w pełnym nasieniu wynosiło 204,3 ±18,5 pg/ml, podobne wartości obserwowano w osoczu nasienia (172,6±11,3 pg/ml) i w plemnikach (194,2±12,6 pg/ml). Enzymatyczna hydroliza uwolniła pięcioaminokwasowe, fizjologicznie aktywne cząsteczki Met-enkefaliny głównie z plemników. Stężenie związanej formy peptydu w tych komórkach wyniosło 567,5±29,7 pg/ml i było trzykrotnie wyższe od wartości wolnej enkefaliny (P<0.01). Znacznie mniejszy wzrost stężenia związanej Met-enkefaliny do 292,1±23,4 pg/ml (44%) zaobserwowano po enzymatycznej hydrolizie pełnego nasienia. Niespodziewanie, nie zaobserwowano istotnego uwolnienia enkefaliny z białek osocza nasienia.

Wnioski . 1.Endogenne peptydy opioidowe znajdują się w plemnikach ogiera w postaci wolnej i związanej z większymi białkami prekursorowymi.

2.Osocze nasienia zawiera inhibitory trypsyny i karboksypeptydazy B zapobiegające uwalnianiu fizjologicznie czynnych enkefalin.

Finansowane w ramach projektu rozwojowego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr: R1202102

10 LAT DOŚWIADCZEŃ W BADANIU *CFTR*/AZF U MĘŻCZYZN Z AZOOSPERMIĄ

10 YEAR EXPERIENCE OF *CFTR*/AZF ANALYSIS IN AZOOSPERMIC MEN

Agnieszka Sobczyńska-Tomaszewska¹, Katarzyna Wertheim¹, Magdalena Nawara¹,
Jan Karol Wolski², Michał Radwan³

¹ Instytut Matki i Dziecka, Zakład Genetyki Medycznej, Warszawa, ul. Kasprzaka 17a, 01-211, agnieszk@imid.med.pl

² Przychodnia Leczenia Niepłodności NOVUM, Warszawa, ul. Bociania 13, 02-807

³ Centrum Leczenia Niepłodności GAMETA, Łódź, ul. Leszczyńskiej 20, 93-347

Wstęp: Mutacje w genie *CFTR*, których znanych jest obecnie ponad 1500, są przyczyną mukowiscydozy (*Cystic Fibrosis*, CF), jednej z najpowszechniejszych chorób w rasie kaukaskiej (1/2500 ż.u.) i dziedziczonej w sposób autosomalny recesywny. Mutacje w tym samym genie są także identyfikowane w innych jednostkach chorobowych, jak np. w męskiej niepłodności spowodowanej wrodzonym obustronnym zanikiem nasieniowodów - CBAVD lub obstrukcyjną azoospermią. Z tego względu analiza mutacji w genie *CFTR* powinna poprzedzać procedurę IVF. Zgodnie z zaleceniami EAA/EMQN u pacjentów z azoospermią powinna zostać także przeprowadzona analiza mikrodelecji w regionie AZF na chromosomie Y, gdzie zlokalizowane są geny kodujące białka zaangażowane w spermatogenezę. Istnieją trzy regiony AZF - AZFa, AZFb i AZFc. W przypadku obecności mikrodelecji nie jest wskazane kwalifikowanie pary do procedury TESE/ICSI. Pacjenci z delecjami w obrębie AZF znajdują się ponadto w grupie podwyższonego ryzyka urodzenia dziecka z zespołem Turnera (45,X) i innymi nieprawidłowościami genotypowymi związanymi z mozaicyzmem chromosomów płciowych.

Cel pracy: Przedstawiamy wyniki badań molekularnych 1169 pacjentów z azoospermią obstrukcyjną i nieobstrukcyjną wykonanych w latach 1997-2007 w Pracowni Diagnostyki Molekularnej Niepłodności IMiD.

Materiały i metody: Standardowe badanie molekularne obejmowało poszukiwanie mutacji w genie *CFTR* i/lub mikrodelecji w regionie AZF. W przypadku genu *CFTR* badano panel 7 najczęstszych mutacji w populacji polskiej (F508del, dele2,3(21kb), R117H, G542X, G551D, R553X oraz wariant IVS8-5T). Dla grupy 54 pacjentów z CBAVD wykonano analizę wszystkich 27 eksonów genu *CFTR*. Analiza mikrodelecji regionu AZF obejmowała loci: AZFa (loci sY84 oraz 86), AZFb (loci sY127 oraz sY134), AZFc (loci sY254 oraz 255). W niektórych przypadkach badany panel mutacji był modyfikowany zgodnie z indywidualnym zaleceniem lekarza.

Wyniki: U 155 mężczyzn (13,25%) znaleziono w genie *CFTR* co najmniej jedną mutację lub wariant IVS8-5T. Najczęściej identyfikowano wariant IVS8-5T oraz mutację F508del. U 15 pacjentów zidentyfikowano mikrodelecje w regionie AZF.

Wnioski: Częstość nosicieli mutacji F508del była jedynie nieznacznie zwiększona w naszej grupie pacjentów w porównaniu z wartością oczekiwaną (1/43 vs 1/45). Częstość tej mutacji w podgrupie pacjentów z CBAVD była natomiast 8 razy wyższa niż wartość oczekiwana (1/5,75 vs 1/45). Spośród 15 przypadków mikrodelecji zidentyfikowanych u pozostałych osób najczęstsze obejmowały region AZFc. Wskazaniem do analizy mutacji w genie *CFTR* jest zatem azoospermia obstrukcyjna, natomiast do analizy mikrodelecji w regionie AZF - azoospermia nieobstrukcyjna.

Zważywszy na korzyści wynikające ze znajomości wyników analizy molekularnej genu *CFTR* i regionu AZF oraz jej relatywnie niski koszt, proponujemy wykonywanie obu tych badań zarówno u pacjentów z azoospermią obstrukcyjną, jak i nieobstrukcyjną, ze względu na fakt, iż biopsja jądra często wykonywana jest po zakwalifikowaniu pary do procedury ICSI. Na świecie istnieją już programy badań genetycznych obejmujące analizę najczęstszych mutacji genu *CFTR* w danej populacji, które proponowane są parom planującym potomstwo, również bez problemów niepłodnościowych.

ZMIANY MORFOLOGICZNE I BIOCHEMICZNE PLEMNİKÓW PSA PRZECHOWYWANYCH W TEMPERATURZE + 4°C

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN DOG SPERMATOZOA FOLLOWING LIQUID STORAGE AT + 4°C

Rafał Strzeżek, Magdalena Koziorowska-Gilun, Karol Jabłoński, Tomasz Adamczyk

*Uniwersytet Warmiński -Mazurski w Olsztynie, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt,
10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 5, e-mail kbz@uwm.edu.pl*

Celem badań była ocena tempa starzenia się plemników psa pochodzących z pełnych ejakulatów, poddanych długookresowej konserwacji w stanie płynnym.

Materiał do badań stanowiły pełne ejakulatory pochodzące od 6 psów (5 mieszańców, 1 rasy Beagle) w wieku od 2 do 8 lat. Psy podzielono na 3 pary technologiczne. Ejakulatory poddano konserwacji w stanie płynnym w temperaturze +4°C przez okres 48 godzin, z zastosowaniem rozcieńczalnika Tris – cytrynian - fruktoza. Analizy laboratoryjne, wykonywane po 3, 6, 24 i 48 godzinach od momentu rozrzedzenia, obejmowały mikroskopowo i wspomaganą komputerowo (Sperm Vision Test ver.2.1) ocenę ruchliwości (w obecności i bez kofeiny); określenie zmian integralności błon plazmatycznych plemników (Water test oraz barwienie fluorescencyjne z użyciem kombinacji fluorochromów CFDA/PI); ocenę statusu błon mitochondrialnych (barwienie fluorescencyjne z użyciem kombinacji fluorochromów R123/PI) oraz ocenę sprawności metabolicznej plemników (zmiany zawartości ATP). Ponadto określano aktywność systemu akrosynowego plemników.

Stwierdzono znaczący spadek ruchliwości plemników po 24 godzinach przechowywania. Istotne zmiany integralności plazmolemy obserwowano natomiast po upływie 48 godzin. Nie stwierdzono zakłóceń mechanizmu syntezy ATP w plemnikach. Po 24 godzinach wykazano wzrost aktywności akrosyny oraz spadek aktywności proakrosyny w ekstraktach plemników. Najwyższą aktywność inhibitorów akrosyny stwierdzono w plazmie nasienia pochodzącej z frakcji plemnikowej i poplemnikowej (prostatowej).

Rezultaty badań sugerują, że obecność komponentów pełnej plazmy nasienia korzystnie oddziałuje na stabilność plazmolemy konserwowanych plemników psa.

Praca wykonana w ramach tematu badań własnych UWM nr 0103.0206.

BADANIE WYBRANYCH CECH NASIENIA KNURÓW TRANSGENICZNYCH

EXAMINATION OF SOME STANDARD PARAMETERS OF TRANSGENIC BOARS' SEMEN

Barbara Szczęśniak-Fabiańczyk¹, Barbara Gajda¹, Ryszard Słomski², Zdzisław Smorąg¹,
Stanisław Gerepka³, Waldemar Kowalski³, Mirosław Koska³

¹ Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki - PIB, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice,
e-mail: bfabianc@izoo.krakow.pl

² Instytut Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,

³ Stacja Badawcza Trzody Chlewnej, Sp. z o.o. Żerniki Wielkie, 55-020 Żórawina.

Celem pracy była ocena jakości nasienia knurów transgenicznych dla genu fukozylotransferazy człowieka.

Badania przeprowadzono na 6 knurach transgenicznych pokolenia F1 i F2 oraz 3 knurach nietransgenicznych (2 pbz, 1 wbp). Wiek knurów wahał się w przedziałach od 11-28 miesięcy w grupie doświadczalnej i 8-32 miesięcy w grupie kontrolnej. Nasienie pobierano raz w miesiącu i oceniano następujące jego parametry: objętość ejakulatu, koncentrację, ruchliwość, osmolowość, pH oraz morfologię plemników. Ponadto sprawdzano podatność na konserwację - nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikiem komercyjnym BTS i przechowywano w temperaturze ok. +15 °C.

Oceniono łącznie 18 ejakulatów pochodzących od knurów transgenicznych (od 1 do 6 ejakulatów od knura) i 29 ejakulatów pochodzących od knurów nietransgenicznych (11 i 6 ejakulatów od knurów pbz i 12 ejakulatów od knura wbp). Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Cechy nasienia knurów transgenicznych i nietransgenicznych (czystorasowych)

Cechy	Knury transgeniczne			Knury nietransgeniczne		
	Średnie	Wartości min.	max.	Średnie	Wartości min.	max.
Objętość ejakulatu (ml)	169,4	80	230	203,8	120	350
Koncentracja (tyś/mm ³)	416,9	199	637	412,6	272	597
Ruchliwość po pobraniu (%)	67,5	40	80	73,6	5	90
Osmolowość	323,2	301	341	319,1	303	344
pH	7,63	7,39	7,98	7,70	7,47	8,05
Ocena morfologiczna:						
plemniki normalne (%)	70,8	18,6	97,2	67,7	9,3	99,0
plemniki z wadami głównymi (%)	11,1	1,0	63,2	8,5	0,0	26,6
plemniki z wadami podrzędnymi (%)	18,1	1,4	54,0	23,8	1,0	64,1
Podatność na konserwację:						
ruchliwość po 1 dniu (%)	56,1	15	90	56,3	5	80
ruchliwość po 4 dniach (%)	45,0	5	75	46,7	0	70
ruchliwość po 7 dniach (%)	33,1	0	65	42,1	0	65
przeżywanie (dni)	6,4	0	18	8,2	0	15

Stwierdzono, że badane parametry nasienia knurów transgenicznych nie odbiegają od obserwowanych u knurów nietransgenicznych w tej samej grupie wiekowej.

FRAP JAKO METODA OZNACZANIA CAŁKOWITEJ ZDOLNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ PLAZMY NASIENIA MĘSKIEGO

FRAP AS AN ANALYTICAL METHOD FOR ASSESSING TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY (TAC) OF HUMAN SEMINAL PLASMA

Joanna Tkaczuk-Włach¹, Edyta Albera², Grzegorz Jakiel¹

¹ Katedra i Klinika Rozrodczości i Andrologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul. Probostwo 4, 20-089 Lublin; e-mail: androlub@am.lublin.pl

² Katedra Biochemii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: edytaal@interia.pl

Plazma nasienia, tworząca naturalne środowisko dla plemników, jest bogatym źródłem obrony antyoksydacyjnej dla męskich komórek rozrodczych, poddawanych szkodliwemu działaniu reaktywnych form tlenu.

Całkowita zdolność antyoksydacyjna umożliwia szybką orientację, co do obecności i poziomu antyoksydantów w badanej próbce.

Cel pracy:

Oznaczenie spektrofotometryczne całkowitej zdolności antyoksydacyjnej plazmy nasienia męskiego metodą, wykorzystującą pomiar zdolności badanej próbki do redukcji jonów Fe^{3+} , nazywanej powszechnie metodą FRAP (ang. Ferric Reducing Ability of Plasma). Dodatkowo dla określenia statusu oksydoredukcyjnego badanej plazmy wykonano jednocześnie pomiar poziomu produktów lipoksydacji.

Materiał i metody:

Do badań wykorzystano plazmę nasienia 69 mężczyzn z par diagnozowanych z powodu niepłodności w Klinice Rozrodczości i Andrologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Plazmę nasienia uzyskano przez odwirowanie z nasienia, po jego wcześniejszym upłynięciu i przeprowadzeniu standardowej analizy laboratoryjnej, według zasad ustalonych przez WHO.

Poziom produktów lipoksydacji określono za pomocą oznaczenia poziomu substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym TBA (ang. TBA-reactive substances; TBARS).

Wyniki oznaczeń FRAP i TBARS w plazmie nasienia wyrażane były w $\mu\text{mol/g}$ białka.

Wyniki:

Stwierdzono istotnie statystycznie związek między poziomem całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, mierzonej metodą FRAP w plazmie nasienia a gęstością nasienia oraz ruchliwością plemników, zarówno w ruchu A jak i A+B (odpowiednio $R = -0,97$, $p < 0,000001$; $R = -0,67$, $p < 0,000001$).

Między poziomem FRAP w plazmie nasienia a morfologią plemników stwierdzono istotną statystycznie dodatnią korelację ($R = 0,42$, $p = 0,0006$).

Wykazano również istotną statystycznie korelację dodatnią między poziomem FRAP w plazmie nasienia a poziomem stresu oksydacyjnego, mierzonego poziomem TBARS ($R = 0,43$; $p = 0,0004$).

Wnioski:

Wartości oznaczeń FRAP w plazmie nasienia korelują z parametrami nasienia oznaczanymi według standardów WHO.

Przydatność kliniczna oznaczeń FRAP jako ewentualnej metody diagnostycznej do zastosowania w laboratorium andrologicznym wymaga dalszych badań.

OCENA ZMIAN APOPTOTYCZNYCH W NASIENIU KNURÓW TRANSGENICZNYCH I NIETRANSGENICZNYCH

EVALUATION OF APOPTOTIC CHANGES IN TRANSGENIC AND NON-TRANSGENIC BOARS' SEMEN

Monika Trzcińska¹, Magdalena Bryła¹, Ryszard Słomski^{2,3}, Zdzisław Smorąg¹

¹*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki-PIB, Balice*
e-mail: mcala@izoo.krakow.pl

²*Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań*

³*Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań*

Celem badań była ocena zmian apoptotycznych w nasieniu 5 knurów nietransgenicznym oraz 5 transgenicznym (wykazujących ekspresję rekombinowanej α -1,2-fukozylotransferazy; konstrukcja genowa *pCMVFUT*) uzyskanych dla potrzeb ksenotransplantacji. Ogółem przebadano 50 ejakulatów (5 ejakulatów/knur). Analiza obejmująca ocenę nasienia świeżego polegała na identyfikacji zmian w błonie komórkowej za pomocą fluorochromu YO-PRO-1 i jodku propydy (PI). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic w odsetku plemników apoptotycznych, nekrotycznych i żywych w nasieniu knurów nietransgenicznym. W nasieniu knurów transgenicznym, wysoko istotne statystycznie różnice odnotowano tylko w odsetku plemników żywych i nekrotycznych ($P < 0,01$). Stwierdzono ujemną korelację ($r = -0,718$) pomiędzy ruchliwością a ilością plemników nekrotycznych w nasieniu knurów transgenicznym i nietransgenicznym.

PROTEKCJA KOMÓREK GENERATYWNYCH DO PROCEDUR IVF/ICSI-TESE W PRZYPADKACH NOWOTWORU DRUGIEGO JĄDRA U MĘŻCZYZN Z AZOOSPERMIĄ I AEJAKULACJĄ

PROTECTION OF GENERATIVE CELLS FOR IVF/ICSI-TESE PROCEDURES IN CASES OF CONTRALATERAL TESTICULAR CANCER IN MEN WITH AZOOSPERMIA AND ANEJACULATION

Jan Karol Wolski¹, Tomasz Demkow², Hanna Marszał¹, Karolina Leśniewska¹, Sylwia Trubacz¹, Joanna Barańska³, Przemysław Kluge⁴, Barbara Pawłowska⁵, Alicja Ilnicka⁵, Agnieszka Sobczyńska-Tomaszewska⁶, Katarzyna Koziół¹, Piotr Lewandowski¹

¹ Przychodnia Leczenia Niepłodności „Novum”, 02-807 Warszawa, Bociania 13; jkwolski@op.pl

² Klinika Nowotworów Układu Moczowego, Centrum Onkologii–Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 02-781 Warszawa, W.K. Roentgena 5

³ Zakład Patologii, Centrum Onkologii–Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 02-781 Warszawa, W.K. Roentgena 5

⁴ Zakład Patologii, Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, 04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20

⁵ Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii, 02-957 Warszawa, ul. Sobieskiego 9

⁶ Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, 01-211 Warszawa, Kasprzaka 17 a

Wstęp: Choć wśród przyczyn niepłodności męskiej nowotworowe uszkodzenie spermatogenezy wymienia się, po anorchii i dysgenezji, na trzecim miejscu, [European Association of Urology, Guidelines 2007], to guzy jąder występują w populacji rzadko, stanowiąc zaledwie 1-1,5% wszystkich schorzeń onkologicznych u mężczyzn. Niepłodność zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania na nowotwory gonad nawet 10-20 razy [J Urol. 2005]. Ponadto, u 1,5-5,2 % pacjentów leczonych uprzednio z powodu guza jądra, może rozwinąć się nowotwór w drugiej gonadzie [Cancer 2002]. Mimo istotnego postępu w leczeniu raka jądra, nadal pozostaje nierozwiązany problem protekcji płodności pacjentów. Liczba mrożeń onkologicznych nasienia jest niewspółmiernie mniejsza w porównaniu z liczbą operowanych, co istotnie utrudnia bądź uniemożliwia wyleczonym mężczyznom rozród w przyszłości. Od czasu wprowadzenia kriokonserwacji nasienia (Polge 1949), a następnie uzyskania pierwszej ciąży z rozmrożonych plemników (Bunge, Sherman 1953) [AM Jequier „Male infertility. A guide for the clinician” Blackwell 2000], wprowadzenie metody IVF/ICSI (Palermo 1992) wraz z pozyskiwaniem komórek generatywnych bezpośrednio z gonady (PESA, MESA, TESA, TESE, mTESE) daje szansę ojcostwa praktycznie wszystkim onkologicznym pacjentom.

Cel: Przewiedzenie dwóch przypadków mężczyzn po nowotworowej orchidektomii w wywiadzie, z rozpoznanym guzem drugiego jądra (dodatkowo, pierwszy pacjent z aejakulacją, drugi z azoospermią), u których przed usunięciem gonady śródoperacyjnie zabezpieczono tkankę jądrową na poczet przyszłego protokołu IVF/ICSI.

Materiał i metody: Pacjent 1: R.K.(1974) operowany w wieku 21 lat (1995) guz jądra prawego - *Carcinoma embryonale* z dodatkiem *chorioncarcinoma*, bez naciekania błony białawej oraz powrózka (pT1). Z powodu utrzymującego się po zabiegu operacyjnym podwyższonego poziomu markerów (bhCG i aFP), chorego poddano leczeniu uzupełniającemu - 3 kursy chemioterapii BEP, a następnie zakwalifikowano do limfadenektomii zaotrzewnowej (RPLND 1996). Przed terapią choremu nie zaproponowano zamrożenia nasienia. W konsekwencji usunięcia węzłów chłonnych wystąpił całkowity brak ejakulacji (aspermia), przy prawidłowym libido oraz satysfakcjonującej erekcji. Po zakończeniu leczenia chory był poddany rutynowej obserwacji lekarskiej, ponadto zalecono samokontrolę. W 2006 roku (11 lat po pierwszej operacji) pacjent stwierdził zmienioną konsystencję górnego bieguna jądra lewego. Badanie USG wykazało obecność ogniska hypoechogenego 15 x 9 x 17 mm. Rozpoznano wstępnie guz jądra, wykonano standardową diagnostykę, stwierdzając niepodwyższone markery (bhCG i aFP) i zakwalifikowano mężczyznę do leczenia operacyjnego - orchidektomii radykalnej. Wobec faktu zgłoszenia przez pacjenta chęci posiadania dzieci (stały związek partnerski z planowaną prokreacją), jednocześnie z zabiegiem orchidektomii zaplanowano zabezpieczenie komórek generatywnych na poczet przyszłego rozrodu z dolnej części gonady lewej, gdzie wstępnie nie było podejrzenia rozrostu nowotworowego. Operacja 27.04.2006 z dostępu przez kanał pachwinowy wyłoniono powrozek nasienny, założono klem i pobrano z dolnego bieguna jądra

fragmenty tkanki oddalone od stwierdzanego palpacyjnie i widocznego w USG guza. Na sali operacyjnej większą część biopsatu umieszczono w Sperm Preparation Medium (MediCult), pozostałą utrwalono w płynie Bouin'a do badania histologicznego. Następnie, w termoizolacji (ok. 36.6° C), niezwłocznie przewieziono tkankę w medium do Laboratorium IVF-ICSI, gdzie poddano ją wstępnej ocenie mikroskopowej. Po stwierdzeniu obecności prawidłowych plemników, poddano zamrożeniu do temperatury ciekłego azotu (-195° C) i umieszczono w banku tkanek. Równolegle, zespół operacyjny, po uzyskaniu informacji o wyniku badania doraźnego guza jądra (*Seminoma*) wykonał orchidektomię radykalną lewostronną, bez implantacji protez jąder, z uwagi na brak zgody pacjenta.

Pacjent 2: P.K. (1978), operowany z powodu guza jądra lewego w 25 rż. (2003)– *Seminoma*, pT1, następowa radioterapia, pod stałą opieką Centrum Onkologii. Zgłosił się do Przychodni Novum w styczniu 2008 z powodu zaawansowanej oligozoospermii (100 tys. plemników/ mL nasienia). W trakcie przygotowań do IVF/ICSI, w marcu 2008 rozpoznano guz dolnego bieguna jądra prawego oraz stwierdzono azoospermie. Operowany 03.2008 (Centrum Onkologii) – orchidektomia radykalna prawostronna, z pobraniem na bloku operacyjnym tkanki z górnego bieguna gonady do mrożenia (MediCult), transport w termoizolacji do laboratorium IVF. W badaniu doraźnym przed mrożeniem stwierdzono obecność tylko dwóch plemników.

Wyniki: Pacjent 1: Wynik badania histopatologicznego: część gonady z guzem - *seminoma pT 1*, a części zamrożonej – fragment jądra o budowie prawidłowej, z obrazem dojrzewania do prawidłowych morfologicznie plemników, nie znaleziono obrazów Intratubular Germ Cell Neoplasia, ITGCN (*carcinoma-in-situ*, CIS - Skakkebaek, 1972). Nie stwierdzono powikłań w okresie pooperacyjnym, rana zagoiła się przez rychłozrost. W ramach przygotowania do planowanego IVF-ICSI/TESE wykonano u pacjenta standardowe badania genetyczne: kariotyp - prawidłowy męski 46,XY; mutacje genu CFTR (-); delecje regionu AZF chromosomu Y (-). Ponadto, choremu wdrożono pełną substytucję androgenową, uzyskując dobrą odpowiedź kliniczną. W chwili obecnej oczekuje się na decyzję pacjenta i partnerki o momencie przystąpieniu do protokołu IVF/ICSI-TESE (planowane ukończenie studiów i legalizacja związku). Pacjent 2: Wynik badania histopatologicznego: *seminoma pT1*, tkanki z linii cięcia – komórki *Intratubular Germ Cell Neoplasia (ITGCN)*; nie znaleziono w tym obszarze plemników. Gojenie rany powikłane przedłużonym wyciekami płynu limfatycznego. Po 3 tygodniach od operacji u pacjenta wystąpiły klasyczne objawy wypadania, włączono stałą suplementację androgenową oraz zaplanowano implantację protez jąder po zakończeniu leczenia uzupełniającego. W chwili obecnej rozpoczęto przygotowania małżonki do protokołu IVF/ICSI-TESE.

Wnioski: 1. Krioprezervacja komórek generatywnych u pacjentów onkologicznych, zwłaszcza z nowotworem jąder, przed planowanym leczeniem radykalnym daje szansę choremu na włączenie go do rozrodu w przyszłości w protokole IVF/ICSI.

2. W przypadkach azoospermii jak i aejakulacji można wykorzystać procedurę pozyskania plemników bezpośrednio z śródoperacyjnie zabezpieczonej tkanki jądra.

3. Każdy chory onkologiczny powinien być informowany o różnych możliwościach bankowania komórek generatywnych przed wdrożeniem leczenia.

WPLYW NISKICH DAWEK OŁOWIU NA IMMUNOEKSPRESJĘ I AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH W NAJĄDRZU DOJRZAŁYCH PŁCIOWO SZCZURÓW

INFLUENCE OF LOW LEAD DOSES ON ANTIOXIDANT ENZYMES IMMUNOEXPRESSION AND ACTIVITY IN ADULT RAT EPIDIDYMIS

Monika Zawisłak¹, Bartosz Zawisłak¹, Irena Baranowska-Bosiacka², Barbara Wiszniewska¹, Agnieszka Kolasa¹, Dariusz Chlubek², Małgorzata Świder Al-Amawi¹, Mariola Marchlewicz¹

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii oraz ²Katedra Biochemii i Chemii Medycznej
Pomorskiej Akademii Medycznej 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72
e-mail: mola@sci.pam.szczecin.pl

CEL PRACY

Wieloletnie badania przeprowadzone w Zakładzie Histologii i Embriologii PAM dotyczące wpływu ołowiu (Pb) na układ płciowy samców szczurów Wistar wykazały, że pierwiastek ten bardziej uszkadza najądrze niż jądro. Przewlekła ekspozycja na Pb powodowała zwiększenie stężenia nadtlenków lipidów w homogenatach najądrza oraz będącą następstwem tego, wzmożoną chemiluminescencję (ultrasłaba emisja światła) z tych homogenatów oraz obniżenie zawartości kwasu askorbinowego w homogenatach najądrza. Zwiększenie ilości reaktywnych form tlenu oraz zmiany stężeń substancji o działaniu antyoksydacyjnym w najądrzu intoksykowanych zwierząt, w porównaniu do grupy kontrolnej, mogą świadczyć o zaburzeniu równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Z uwagi na ten fakt wykorzystano ekspozycję dojrzałych płciowo szczurów na ołów, jako modelowy przykład oddziaływania ksenobiotyków na najądrze - ważny odcinek męskiego układu płciowego.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta I grupy doświadczalnej otrzymywały przez 9 miesięcy (czas trwania 5 spermatogenezy) do picia 1% wodny roztwór octanu ołowiu – $Pb/CH_3COO/2 \cdot 3H_2O$ (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice) (Pb), II grupy doświadczalnej otrzymywały 1% wodny roztwór octanu ołowiu z troloksem, rozpuszczalnym w wodzie analogiem tokoferolu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), (Sigma/Aldrich, Polska) w dawce 48 mg/L roztworu octanu ołowiu (Pb + troloks). Zwierzęta III grupy doświadczalnej otrzymywały do picia 1% wodny roztwór octanu ołowiu z tokoferolem (Medana, Polska) w dawce 200 mg/kg m.c./dobę (Pb + wit. E). Zwierzęta grup kontrolnych otrzymywały do picia odpowiednio wodę destylowaną (K), wodę destylowaną z troloksem (K+troloks), wodę destylowaną z tokoferolem (K+wit. E) w dawkach jak powyżej. Po zakończeniu doświadczenia szczury usypiano przy użyciu Thiopentalu (Biochemie GmbH, Austria) w dawce 200 mg/kg i.p. Pobrany z serca krew przeznaczono do oznaczeń. Wypreparowane jądra i najądrza, po zważeniu, przeznaczono do badań immunohistochemicznych i biochemicznych.

Oznaczanie glutationu wykonano z wykorzystaniem standaryzowanego zestawu Bioxytech® GSH-400 (Oxis, Polska). Do badań przygotowano 10% homogenaty tkanek głowy i ogona najądrzy (w/v) w 5% roztworze kwasu metafosforowego (Sigma, Polska). Absorbancję mierzono przy długości 400 nm za pomocą termostatowanego spektrofotometru – Beckman DU 650). Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenukowej (SOD-1), katalazy (CAT), reduktazy glutationu (GR) wykonano z wykorzystaniem standaryzowanych zestawów (Oxis, Polska). Wszystkie odczynniki zostały użyte ściśle wg instrukcji zawartej w zestawie.

W celu zbadania immunoekspresji dysmutazy ponadtlenukowej w komórkach jąder i najądrzy preparaty histologiczne inkubowano 60 min. w temp. pokojowej z mysim monoklonalnym przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko SOD-1 (NCL-SOD1, clone 30F11; Novocastra Lab. Ltd) w stężeniu końcowym 1:25. Dla uwidocznienia kompleksu antygen-przeciwciało zastosowano zestaw EnVision⁺System-HRP (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) opierający się na reakcji avidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa z diaminobenzydyną (DAB) jako chromogenem. Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym (Axioskop Zeiss, Niemcy). Jako pozytywny wynik reakcji uznano brązowy odczyn w cytoplazmie komórek. Dla sprawdzenia specyficzności wiązania przeciwciała pierwszorzędowego, wykonano reakcję z pominięciem tego przeciwciała.

WYNIKI

Przewlekła intoksykacja ołowiem nie wywołała klinicznych cech zatrucia. Masa ciała, jąder i najądrzy tych zwierząt nie różniły się od stwierdzonych w grupie kontrolnej. Traktowanie ołowiem spowodowało istotne zwiększenie stężenia Pb we krwi, homogenatach jąder oraz głowy i ogona najądrzy. Wykazano istotne zwiększenie aktywności CAT w głowie i istotne obniżenie aktywności katalazy w ogonie najądrzy szczurów traktowanych przewlekłe niskimi dawkami ołowiu. Ponadto wykazano istotne zwiększenie aktywności GR zarówno w głowie, jak i w ogonie najądrzy tych zwierząt, co mogło być przyczyną braku istotnych różnic w stężenia zredukowanego glutationu w tych tkankach. Aktywność SOD w badanych odcinkach najądrzy szczurów intoksykowanych Pb uległa istotnemu zwiększeniu, co znajdowało swoje odzwierciedlenie w immunoekspresji SOD w skrawkach najądrzy.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ ołowiu na zachwianie równowagi pro- i antyoksydacyjnej w najądrzu o czym mogą świadczyć zmiany aktywności enzymów utrzymujących tę równowagę. Zaobserwowane uszkodzenia i zmniejszenie liczby plemników w świetle przewodu najądrza intoksykowanych szczurów mogą świadczyć o niedostatecznym wyposażeniu najądrza w mechanizmy chroniące przed stresem oksydacyjnym (wywołanym przez przewlekłą intoksykację niskimi dawkami ołowiu).

POLIMORFIZM ELEKTROFORETYCZNY SYSTEMÓW BIAŁKOWYCH RÓŻNYCH FRAKCJI EJAKULATU KNURA

ELECTROPHORETIC POLYMORPHISM OF PROTEIN SYSTEMS IN DIFFERENT FRACTIONS OF BOAR EJACULATE

Paweł Wysocki, Aleksandra Deszczka, Jerzy Strzeżek

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, ul. Oczapowskiego 5, 10-718
Olsztyn-Kortowo, e-mail: kbz@uwm.edu.pl

Plazma nasienia knura zawiera różne typy białek, które w warunkach fizjologicznych agregują do form strukturalnych różniących się masą cząsteczkową, składem i zdolnością wiązania z receptorami plazmolemy plemników. Celem badań była standaryzacja profili elektroforetycznych białek płynów sekrecyjnych układu rozrodczego knura uzyskanych wyniku różnych postępowań kolekcjonowania ejakulatów (pełny ejakulat, frakcja gęsta, wazektomia) oraz manipulacji laboratoryjnych (dializa wobec H₂O, dializa wobec rozcieńczalnika Kortowo-3 (K-3)). Jako odniesienie kontrolne posłużyły profile elektroforetyczne białek płynu gruczołów pęcherzykowych i ogona najądrzy.

W uzyskanych po odwirowaniu płynach (8000 x g, 10 min.) oznaczano zawartość białka ogólnego metodą wg Lowry, a następnie przez zastosowanie odpowiedniego stopnia rozcieńczenia (0,85% NaCl) ustalano jego końcową zawartość na 1 mg/ml. Rozdziały elektroforetyczne białek prowadzono przy zastosowaniu metody PAGE i SDS-PAGE. Żele wybarwiano z wykorzystaniem błękitu Coomassie (PAGE) lub metodą srebrną (SDS-PAGE). Elektroforegramy analizowano z wykorzystaniem programu komputerowego Multi Analyst (BioRad).

Stwierdzono, że w plazmie frakcji gęstej ejakulatu (10 ml) dominują białka pochodzenia najądrzowego (13 frakcji). Natomiast w pozostałej objętości obserwowano białka, których źródłem były gruczoły pęcherzykowe (16 frakcji). Plazma nasienia uzyskana od osobników wazektomizowanych charakteryzowała się zmienionym profilem elektroforetycznym, zwłaszcza brakiem białek o m.cz. 90 kDa i 30-35 kDa. Dializa pełnej plazmy nasienia wobec H₂O dest. powodowała istotne zmiany w profilach elektroforetycznych białek wysoko- i niskocząsteczkowych, w przedziale 95-60 kDa oraz 50-37 kDa. Dializa plazmy nasienia wobec rozcieńczalnika K-3 nie naruszała obrazu elektroforetycznego białek.

Uzyskane rezultaty mogą być wykorzystane w doskonaleniu procedury postępowania technologicznego kriokonserwacji nasienia knura. Dalszych badań wymaga jednak identyfikacja wpływu osobniczego na kompozycję białek.

Praca wykonana w ramach tematu badań statutowych 0103.0803 UWM w Olsztynie

EKSPRESJA GENÓW EGR-1 I PITX-1 W PRZEDNIM PŁACIE PRZYSADKI SAMIC SZCZURA *IN VIVO* PO STYMULACJI RECEPTORA ESTROGENOWEGO TYPU ALFA

EFFECT OF STEROID RECEPTOR ALFA (ERA) STIMULATION ON EGR-1 AND PITX-1 GENES EXPRESSION IN PITUITARY GLAND OF FEMALE RATS, *IN VIVO*

Alina Gajewska¹, Ewa Wolińska-Witort², Andrzej Herman¹, Lech Zwierzchowski³,
Kazimierz Kochman¹

¹ Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna k Warszawy, ² Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, ³ Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec k. Warszawy

Spośród czterech zidentyfikowanych białek regulatorowych wiążących się do promotora genu LHβ (SF-1, sp1, Egr-1 i Pitx-1) białkiem, o kluczowej roli w regulacji transkrypcji genu LHβ, jest białko Egr-1, które do promotora wiąże się w pozycji 112/-105pz oraz -50/-42pz. Pomiędzy sekwencjami wiążącymi białko Egr-1 (-100/-95pz oraz -73/-52 pz) znajdują się 2 miejsca wiązania białka Pitx-1

Celem podjętych badań było określenie czy estradiol i specyficzny receptor estrogenowy alfa mogą modulująco wpłynąć na aktywność transkrypcyjną genów Egr-1 i Pitx-1 w przednim płacie przysadki samic szczura *in vivo*.

Owarietomizowanym samicom szczura z zaimplantowaną do trzeciej komory mózgu kaniulą podawano przez trzy kolejne dni podskórne iniekcje 17β-estradiolu (3x20μg) lub PPT (propyl pyrazolo triol), selektywnego agonisty receptora estrogenowego alfa (3x1,5 mg). Dwie godziny po ostatniej iniekcji, zwierzęta otrzymywały serię pięciu dokomorowych pulsacyjnych infuzji 1nM agonisty (buserelina), 2nM antagonisty (antide) GnRH lub 0.9% NaCl podawanych z częstotliwością 1 pulsu/ 30 min. Analizę ilościową zmian względnego poziomu mRNA dla genów Egr-1 i Pitx-1 przeprowadzano metodą PCR w czasie rzeczywistym używając zestawu DyNAmo™ Sybr-Green 2-step qRT-PCR kit (Finnzymes) przy wykorzystaniu termocyklera Corbett Research (Australia).

Otrzymane wyniki wykazały, iż egzogeny estradiol wywarł przeciwny wpływ na aktywność transkrypcyjną badanych genów stymulując ekspresję genu Egr-1 hamując ekspresję genu Pitx-1. Zaobserwowano też synergistyczne aktywujące oddziaływanie busereliny i estradiolu na ekspresję genu Egr-1 w przysadce, która znacząco wzrosła zarówno w stosunku do poziomu u samic tylko estrogenizowanych jak i w odniesieniu do poziomu u zwierząt owarietomizowanych i otrzymujących sól fizjologiczną.

Odmienne reakcje genu Egr-1 oraz genu Pitx-1 na oddziaływanie steroidowego *milieu* uwidoczniła się jeszcze silniej po aktywacji receptora estrogenowego typu alfa. Po podaniu PPT i infuzjach NaCl ekspresja genu Egr-1 wzrosła znacząco w odniesieniu do poziomu u samic, które otrzymywały estradiol i infuzje NaCl. Również buserelina podana samicom traktowanym PPT zwiększyła ekspresję Egr-1 mRNA w stosunku do ekspresji w grupie traktowanej estradiolem i busereliną. Aktywacja receptora ERα obniżyła natomiast aktywność transkrypcyjną genu Pitx-1: porównanie ekspresji tego genu pomiędzy grupami samic owarietomizowanych, suplementowanych estradiolem lub traktowanych PPT wykazało bowiem, że po infuzjach busereliny wzrost ekspresji był najniższy u zwierząt, które otrzymały iniekcje agonisty receptora ERα.

Uzyskane wyniki wskazują, że aktywność endogenego układu GnRH w podwzgórzu znacząco wpływa na poziom ekspresji genu Egr-1 i w mniejszym stopniu na ekspresję genu Pitx-1 w przednim płacie przysadki samic szczura. Aktywność transkrypcyjna genów Egr-1 i Pitx-1 jest wrażliwa na oddziaływanie estradiolu: stymulujące dla genu Egr-1 natomiast hamujące dla genu Pitx-1. W steroidowej modulacji ekspresji genów Egr-1 i Pitx-1 w przednim płacie przysadki zaangażowany jest receptor estradiolowy ERα.

SALSOLINOL, JAKO PODWZGÓRZOWY CZYNNIK STYMULUJĄCY UWALNIANIE PROLAKTINY U OWCY W OKRESIE LAKTACJI

SALSOLINOL – A PROLACTIN STIMULATING FACTOR IN LACTATING EWE

Konrad Górski¹, Dorota Tomaszewska-Zaremba², Katarzyna Romanowicz¹, Edyta Molik³
Tomasz Misztal¹

¹ Zakład Endokrynologii, ² Zakład Neuroendokrynologii, Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN
im. J. Kielanowskiego, Jabłonna. ³ Zakład Hodowli Owiec i Kóz, Akademia Rolnicza, Kraków.

Salsolinol (1-metylo,6,7-dihydroksy-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina, SAL) jest endogen-nym związkiem katecholowym, pochodną dopaminy (DA), którego obecność stwierdzono w różnych strukturach mózgu szczura i człowieka. Nieliczne dotychczas dane wskazują, że SAL może pełnić rolę neuromodulatora w podwzgórzowym systemie dopaminergicznym i selektywnie stymulować uwalnianie prolaktyny (PRL) z przedniej części przysadki.

Celem naszych badań było sprawdzenie czy SAL jest obecny w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu – wyniosłości pośrodkowej (MBH-ME) u owcy w wczesnym okresie laktacji (28-32 dzień) oraz czy koncentracja tego związku w MBH-ME ulega zmianie pod wpływem impulsu ssania. Ponadto zbadano, czy egzogeny SAL, infundowany do III komory mózgowej, stymuluje uwalnianie PRL u laktujących owiec.

U owiec, będących w drugim miesiącu ciąży implantowano, przy użyciu aparatu stereotaksycznego, stalowe kaniule (ϕ 1,6 mm), prowadzące do MBH-ME i do III komory mózgowej. W doświadczeniu I, wykonywano perfuzje MBH-ME metodą push-pull ($n = 9$), przez okres 5 godzin, od 10:00 do 15:00. Podczas okresu kontrolnego (pierwsze 2,5 godz.), jagnięta nie miały dostępu do wymienia matki, następnie (kolejne 2,5 godz.), ssanie odbywało się pod kontrolą. Prędkość przepływu płynu Ringera-Locke'a wynosiła 7 μ l/min, a objętość perfuzatów zbieranych przez 30 min ok. 200 μ l. W okresie kolekcji zebrano od każdej owcy 9-10 perfuzatów. W doświadczeniu II, SAL infundowany był do III komory mózgowej ($n = 5$) w sposób pulsacyjny, 5 x 1 μ g/20 μ l/10 min, od 12:30 do 15:00. Podobnie zostały wykonane infuzje kontrolne płynu Ringera-Locke'a ($n = 5$). Podczas infuzji jagnięta nie miały dostępu do wymienia matki (od godz. 11:00). W obu doświadczeniach przeprowadzono również kolekcje krwi, od godz. 10:00 do godz. 15:00, co 10 min. Stężenie SAL i DA w perfuzatach oznaczano metodą HPLC, a stężenie PRL w próbkach krwi metodą RIA.

W perfuzatach pobranych z MBH-ME, od owiec będących we wczesnym okresie laktacji, stwierdzono obecność SAL, nie stwierdzono natomiast obecności DA. Stężenie SAL w okresie kontrolnym kształtowało się od $49,3 \pm 22,2$ (SEM) do $62,1 \pm 31,2$ pg/50 μ l natomiast w okresie karmienia jagniąt od $129,8 \pm 26,1$ do $183,2 \pm 56,9$ pg/50 μ l. Istotny ($P < 0,05$) wzrost stężenia SAL odnotowano w początkowej i końcowej fazie karmienia. Stężenie PRL w okresie kontrolnym kształtowało się od $79,4,3 \pm 6,5$ (SEM) do $118,5 \pm 4,4$ ng/ml natomiast w okresie karmienia jagniąt poziom sekrecji PRL był istotnie wyższy, od $142,1 \pm 12,2$ do $174,8 \pm 17,4$ ng/ml ($P < 0,01$ i $P < 0,001$).

Średnie stężenie PRL w okresie infuzji kontrolnej do III komory wynosiło $77,1 \pm 5,7$ ng/ml i nie różniło się istotnie od stężenia PRL przed infuzją $95,2 \pm 5,7$ ng/ml. SAL infundowany do III komory spowodował istotny wzrost ($P < 0,001$) stężenia PRL z $104,0 \pm 44,5$ ng/ml przed infuzją do $137,9 \pm 11,5$ ng/ml w okresie infuzji.

Przedstawione wyniki wskazują, że SAL jest obecny w podwzgórzu laktującej owcy i sugerują, że związek ten może pełnić rolę endogennego czynnika stymulującego sekrecję PRL w okresie laktacji.

ROLA EDOTOKSYNY BAKTERYJNEJ W REGULACJI OSI PODWZGÓRZE – PRZYSADKA – GONADY, EKSPRESJA GENU GNRH, TLR4, IL-1R1, IL-1R2, IL-6R, TNFR1 W PODWZGÓRZU U ANESTRALNYCH OWIEC

THE ROLE OF ENDOTOXIN IN REGULATION OF ACTIVITY HYPOTHALAMIC – PITUITARY – GONADAL AXIS (HPG) IN ANESTROUS EWES - THE EXPRESSION OF GNRH GENE AND TLR4, IL-1R1, IL-1R2, IL-6R, TNFR1 GENES IN THE HYPOTHALAMUS IN ANESTROUS EWES

Andrzej Herman, Dorota Tomaszewska – Zaremba

The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, 05-110 Jabłonna

Wprowadzenie. Endotoksyna bakteryjna, lipopolisacharyd (LPS) jest głównym komponentem zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram – ujemnych. Jest powszechnie stosowana do wywoływania stresu immunologicznego in vivo. Endotoksyna wywołuje silną odpowiedź systemu odpornościowego zwierząt i powoduje supresję funkcji organizmu, które nie są niezbędne do jego przetrwania. Jednym z systemów, którego funkcjonowanie zostaje zaburzone na skutek stresu immunologicznego jest układ rozrodczy. Wykazano, że obwodowe podanie LPS znacznie zmniejsza stężenie hormonu luteinizującego (LH) u wielu gatunków zwierząt, między innymi u szczurów, owiec, bydła, a także u małych człokształtnych. Iniekcja LPS może powodować inhibicję aktywności osi podwzgórze – przysadka – gonady. Stres immunologiczny może oddziaływać na ten układ zarówno na poziomie przysadki poprzez inhibicję sekrecji LH oraz / lub zmniejszenie wrażliwości komórek luteotropowych na stymulację gonadoliberyną (GnRH) jak i na poziomie podwzgórza modulując aktywność neuronów GnRH. Endotoksyna może oddziaływać na te struktury bezpośrednio poprzez receptor rozpoznający LPS – TLR4 oraz / lub pośrednio poprzez uniwersalne mediatory układu odpornościowego takie jak interleukina - 1 β (IL-1 β), interleukina – 6 (IL-6) oraz czynnik martwicy guza α (TNF α), których obecność stwierdzono w płynie mózgowo rdzeniowym.

Cel pracy. Zbadanie wpływu obwodowego podania LPS na ekspresję genu GnRH, oraz ekspresję genów receptorów: TLR4, IL-1R1, IL-1R2, IL-6R, TNFR1 i TNFR2 w wybranych strukturach podwzgórza takich jak okolica przedwzrokowa (POA), brzuszno przyśrodkowe podwzgórze (MBH), przednie podwzgórze (AHA) i wyniosłość pośrodkowa (ME) u anestralnych owiec.

Materiały i metody. Podwzgórze anestralnych owiec były pobrane 2 godziny po dożylniej iniekcji LPS (n = 6) lub soli fizjologicznej (n = 6). Ekspresję genu wyznaczono z zastosowaniem metody Real-Time PCR. Uzyskane produkty amplifikacji zostały zsekwencjonowane w celu potwierdzenia ich specyficzności.

Wyniki. Endotoksyna znacząco obniżyła ilość mRNA dla GnRH w POA, gdzie położona jest większość perikarionów neuronów GnRH, jeszcze silniejszą supresję ekspresji genu GnRH stwierdzono w ME. Natomiast nie zaobserwowano znaczącego wpływu podania LPS na ekspresję genu GnRH w MBH. Nie stwierdzono obecności transkryptu GnRH w AHA. We wszystkich badanych strukturach podwzgórza stwierdzono obecność mRNA dla receptorów: TLR4, IL-1R1, IL-1R2, IL-6R oraz TNFR1, natomiast nie wykryto transkryptu dla TNFR2. Pod wpływem obwodowego podania LPS zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji genów powyższych receptorów w każdej z analizowanych struktur.

Wnioski. Uzyskane wyniki wykazały, że LPS jest silnym modulatorem aktywności osi podwzgórze – przysadka – gonady u anestralnych owiec. Stres immunologiczny spowodował supresję ekspresji genu GnRH w POA oraz zmniejszenie ilości mRNA dla GnRH w ME. Obecność receptora dla endotoksyny, a także wzrost ekspresji jego genu w analizowanych strukturach wskazuje na możliwość bezpośredniego oddziaływania lipopolisacharydu w podwzgórze po przejściu przez barierę krew – mózg. Obecność receptorów dla IL-1, IL-6 i TNF α w podwzgórze świadczy o immunoreaktywności tego narządu, ponadto zwiększenie ich transkrypcji wskazuje na zwiększone stężenie tych mediatorów w obszarze podwzgórza.

WPLYW ENDOTOKSYNY BAKTERYJNEJ (LPS) NA EKSPRESJĘ GENU GNRH I IL-1B W PODWZGÓRZU U ANESTRALNYCH OWIEC

EFFECT OF ENDOTOXIN (LPS) ON GNRH AND IL-1B GENE EXPRESSION IN ANESTROUS EWES

Andrzej Herman, Dorota Tomaszewska – Zaremba

The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, 05-110 Jabłonna

Wprowadzenie. Endotoksyna bakteryjna (LPS) jest powszechnie znana jako silny stymulator aktywności układu immunologicznego. Stres immunologiczny może zmieniać poziom hormonów gonadotropowych we krwi. Podejrzewa się, że pewne cząsteczki, będące nośnikami informacji w obrębie układu immunologicznego mogą również oddziaływać na układ neuroendokrynną na poziomie podwzgórza powodując zmiany w jego aktywności. W obrębie podwzgórza stwierdzono obecność interleukiny - 1 β , cytokiny prozapalnej, która jest jednym z mediatorów podejrzewanych o oddziaływanie na oś podwzgórze – przysadka – gonady. W prowadzonych przez nas równolegle badaniach wykazano znaczący wzrost ilości transkryptu dla receptorów IL-1 β w podwzgórzu pod wpływem obwodowego podania LPS. Nie do końca poznano mechanizm, który pozwala na pojawienie się tej cytokiny w płynie mózgowo – rdzeniowym. Podejrzewa się, że IL-1 β pochodzenia obwodowego ma zdolność przekraczania bariery krew – mózg i tą drogą dostaje się w obręb podwzgórza. Najnowsze prace donoszące o jej syntezie w komórkach nieimmunologicznych, sugerują jednak możliwość jej bezpośredniej syntezy w strukturach podwzgórza.

Cel pracy. Zbadanie wpływu obwodowego podania LPS na ekspresję genu GnRH i IL-1 β w wybranych strukturach podwzgórza takich jak okolica przedwzrokowa (POA), brzuszno przysadkowe podwzgórze (MBH), przednie podwzgórze (AHA) i wyniosłość pośrodkowa (ME) u anestralnych owiec.

Materiały i metody. Podwzgórza anestralnych owiec były pobrane 2 godziny po dożylniej iniekcji LPS (n = 6) lub soli fizjologicznej (n = 6). Ekspresję genu wyznaczono z zastosowaniem metody Real-Time PCR. Uzyskane produkty amplifikacji zostały zsekwencjonowane w celu potwierdzenia ich specyficzności.

Wyniki. We wszystkich badanych strukturach podwzgórza stwierdzono obecność mRNA dla IL-1 β . Podany obwodowo LPS istotnie zwiększył ekspresję genu IL-1 β we wszystkich analizowanych strukturach. Endotoksyna istotnie obniżyła ilość mRNA dla GnRH w POA oraz w ME. Natomiast nie zaobserwowano znaczącego wpływu podania LPS na ekspresję genu GnRH w MBH, oraz nie stwierdzono obecności transkryptu GnRH w AHA.

Wnioski. Uzyskane wyniki wykazały, że istotnym źródłem centralnej IL-1 β obecnej w obszarze podwzgórza są komórki układu nerwowego zlokalizowane w tym rejonie, mogą to być komórki glejowe oraz / lub same neurony. Dokładne zidentyfikowanie rodzaju komórek nerwowych odpowiedzialnych za syntezę centralnej IL-1 β wymaga dalszych, pogłębionych badań. Fakt, że IL-1 β jest uniwersalną cząsteczką syntetyzowaną zarówno przez komórki układu odpornościowego jak i układu nerwowego wydaje się potwierdzać hipotezę, że może być ona w znacznym stopniu odpowiedzialna za komunikację pomiędzy tymi dwoma systemami.

ZALEŻNY OD FOTOPERIODU WPLYW LEPTYNY ORAZ MELATONINY NA SEKRECJĘ TYROKSYNY U OWIEC

PHOTOPERIOD-DEPENDENT EFFECT OF LEPTIN AND MELATONIN ON THYROXINE SECRETION IN SHEEP

Beata Klocek-Górka, Anna Dziurdzia, Małgorzata Szczęsna, Dorota A. Zięba

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie, Katedra Hodowli Owiec i Kóz

Leptyna, tyroksyna oraz trójiodotyronina to hormony odpowiedzialne za regulację tempa przemiany materii oraz utrzymanie właściwego stanu energetycznego organizmu. Wykazanie obecności receptorów leptyny w pęcherzykach gruczołowych tarczycy (Nowak i in., 2002) pozwala sugerować, że hormony te współdziałają ze sobą w utrzymaniu homeostazy organizmu i jednocześnie umożliwiają przystosowanie przebiegu procesów fizjologicznych do zmieniających się warunków otoczenia. Szczególnie wyraźnie zaznacza się to u zwierząt sezonowych np. owiec, poprzez zmieniający się w ciągu roku pobór pokarmu (wysoki - podczas dnia długiego, niski - podczas dnia krótkiego), a w konsekwencji poprzez sezonowe zmiany masy ciała. Głównym czynnikiem środowiskowym modulującym cykliczne zmiany w organizmie jest oddziaływanie światła - fotoperiod. Wiadomym jest, że biologicznym nośnikiem informacji o zmieniającej się długości dnia jest hormon szyszynki - melatonina. Liczne doniesienia potwierdzają udział melatoniny w procesach regulowanych przez leptynę oraz hormony tarczycy.

W oparciu o aktualny stan wiedzy, podjęto próbę wykazania współzależności pomiędzy leptyną, melatoniną i hormonami tarczycy, w warunkach zmieniającego się fotoperiodu u owiec.

Doświadczenia przeprowadzono dwukrotnie podczas długiego dnia (w maju) oraz krótkiego (we wrześniu), w warunkach *in vitro*. Każdorazowo poubojowo od trzech tryczków pobierano tarczycę, z której po usunięciu błony łączno-tkankowej wycinano fragmenty narządu (ok. 50 mg każdy). Tak przygotowane eksplanty hodowano według zmodyfikowanej metody Trowella (1959) w medium składającym się z RPMI oraz F12 (1:1), z 0,5% dodatkiem FCS oraz antybiotyków. Równolegle prowadzono hodowle eksplantów tarczycy w medium z melatoniną (1mg/ml). Po zakończeniu godzinnej ekwilibracji trzykrotnie, co pół godziny, podawano rekombinowaną owczą leptynę (roleptynę), odpowiednio w dawkach 50 oraz 100ng/ml. Podczas czterech godzin trwania doświadczenia, co pół godziny zbierano 1ml pożywki i zastępowano ją świeżą. W zebranych próbach oznaczano koncentrację tyroksyny metodami radioimmunologicznymi.

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano statystycznie istotne ($P < 0,01$), obniżenie sekrecji tyroksyny przez melatoninę, niezależnie od terminu prowadzonych doświadczeń. Dodatek roleptyny do hodowli hamował nieznacznie efekt melatoniny, jednak nie był on statystycznie istotny. Ponadto, wykazano znaczący wpływ długości dnia na uzyskane wyniki. Zaobserwowano, że poziom sekrecji tyroksyny w maju ($84,1 \pm 15,8$ ng/ml) był dwukrotnie wyższy ($P < 0,01$) w porównaniu do wartości tyroksyny uzyskanej we wrześniu ($35,1 \pm 10,1$ ng/ml). Podobny profil wydzielania tego hormonu zachowany był w każdej z prowadzonych grup doświadczalnych.

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie interakcji zachodzących pomiędzy leptyną, melatoniną a tyroksyną u owiec. Dodatkowo potwierdzono sezonową fluktuację sekrecji hormonów tarczycy oraz ich powiązanie ze zmieniającymi się warunkami fotoperiodu. Prawdopodobnie współdziałanie badanych hormonów leży u podstaw mechanizmów odpowiedzialnych za kształtowanie zdolności adaptacyjnych zwierząt do otoczenia.

Słowa kluczowe: leptyna, melatonina, tyroksyna, owce

SEZONOWE ZMIANY W EKSPRESJI BIAŁKA RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH α I β W PRZYSADCE SAMCÓW GĘSI DOMOWEJ

SEASONAL CHANGES IN THE PROTEIN EXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTOR α AND β IN THE PITUITARY GLAND OF DOMESTIC GANDER

Anna Leska, Monika Budzyńska, Luiza Dusza

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; ul. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn, anna.leska@uwm.edu.pl

Cel pracy: Estrogeny odgrywają istotną rolę w regulacji procesów rozrodczych samców ptaków m.in. poprzez wywieranie ujemnego sprzężenia zwrotnego na przysadkę i podwzgórze. Poza tym, estrogeny pochodzące z mózgowej konwersji testosteronu, odpowiadają za aktywację behawioru seksualnego u samców ptaków. Biologiczne oddziaływanie estrogenów na tkanki odbywa się przez dwa rodzaje receptorów estrogenowych α i β (ER α i ER β). Wiedza na temat sezonowych zmian w ekspresji ER u ptaków dotyczy jedynie struktur związanych z kontrolą śpiewu. Dotychczas brak informacji o wpływie sezonu na ekspresję ER w przysadce ptaków. Celem pracy było zbadanie sezonowych zmian w poziomie ekspresji białka ER α i ER β w przysadce samców gęsi domowej (*Anser anser f. domestica*), gatunku charakteryzującego się wyraźnie zachowaną sezonowością w rozrodzie.

Materiał i metody: Samce gęsi białej włoskiej odmiany kołudzkiej pochodziły z reprodukcyjnego stada utrzymywanego w standardowych warunkach żywieniowych i świetlnych. Doświadczenie obejmowało trzy charakterystyczne dla rozrodu gęsi okresy: szczyt sezonu rozrodczego (marzec, n=6), brak aktywności rozrodczej (lipiec, n=6) oraz okres jesiennej reaktywacji seksualnej (listopad, n=5). W celu utrwalania tkanek *in situ* zwierzęta perfundowano 4% roztworem paraformaldehydu. Przysadki odwadniano, zatapiano w bloczki parafinowe, a następnie wykonywano preparaty histologiczne (skrawki o grubości 4 μ m). Detekcji białek ER α i ER β dokonywano metodą immunohistochemiczną przy użyciu poliklonalnych mysich przeciwciał anti-ER α i monoklonalnych mysich przeciwciał anti-ER β . Przeprowadzono kontrole negatywne z pominięciem inkubacji z pierwszymi przeciwciałami, a także z zastosowaniem peptydów blokujących pierwsze przeciwciała. Obszary immunopoztywne fotografowano, po czym dokonywano analizy procentowej powierzchni jąder (% area) wykazujących ekspresję badanych antygenów oraz intensywności reakcji (mean color intensity, jednostki umowne) wykorzystując program komputerowy cell D Soft Imaging System (Olympus).

Wyniki: Zaobserwowano lokalizację ER α i ER β w jądrach komórek przysadki mózgowej samców gęsi. Jądra komórkowe wykazujące ekspresję ER α i ER β były rozmieszczone równomiernie na całym przekroju przysadki i zajmowały średnio 5,7-10,5% powierzchni dla ER α oraz 12,3-15,2% dla ER β . Stwierdzono sezonowe zmiany w ekspresji ER α i ER β w obu badanych parametrach. Wykazano istotny spadek ekspresji białka ER α ($p<0,01$) w okresie braku aktywności rozrodczej w porównaniu do sezonu rozrodczego. Zaobserwowano również tendencję do wzrostu ekspresji ER α w okresie reaktywacji seksualnej ($p<0,09$). Odwrotna zależność miała miejsce w przypadku ekspresji białka ER β , która istotnie ($p<0,05$) wzrosła po zakończeniu aktywności rozrodczej, co dotyczyło zarówno zwiększenia powierzchni immunoreaktywnej jak i znacznego wzrostu intensywności reakcji. **Wnioski:** Sezonowe zmiany w ekspresji białka ER α i ER β wskazywać mogą na udział receptorów estrogenowych w regulacji procesów rozrodu u samców gęsi.

Praca finansowana przez MNiSW (projekty badawcze: No 0206.0805 oraz N N311 098034) i fundusz EFS (dla AL).

PORÓWNANIE STABILNOŚCI CZĄSTECZEK GnRH I Cu-GnRH W PODWZGÓRZU I PRZYSADCE SAMCÓW SZCZURA, *IN VITRO*

CHANGES OF GnRH AND Cu-GnRH COMPLEX STABILITY IN MALE HYPOTHALAMIC AND PITUITARY TISSUE, *IN VITRO*

Anna Michaluk, Alina Gajewska, Marian Czauderna, Kazimierz Kochman

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN im. J.Kielanowskiego 05-110 Jabłonna k. Warszawy

Celem pracy było porównanie dynamiki degradacji natywnej i skompleksowanej z jonem miedzi cząsteczki GnRH w preparatach podwzgórza i przysadki samców szczura

Kompleks Cu^{2+} -GnRH zsyntetyzowano w wyniku reakcji GnRH z octanem miedzi, zmieszanych w równomolarnym stosunku ligandu do metalu, a otrzymany produkt zweryfikowano analizą jakościową oraz techniką ESI-MS (electrospray ionisation-mass spectrometry). Do badań stabilności natywnej i skompleksowanej z jonem miedzi cząsteczki GnRH, wykorzystano nadsącze i osady otrzymane w wyniku wirowania homogenatów z 18 podwzgórz i 18 przysadek pobranych od samców szczura. Następnie, do określenia dynamiki degradacji egzogenego GnRH i Cu-GnRH użyto po 2,5 µg tych związków, które dodano do przygotowanych nadsącza i osadu z podwzgórz i przysadek. Inkubacje prowadzono w 30°C w obecności lub bez bacytracyny (0,5 mg/ml homogenatu) przez 5, 10, 15, 20, 30, 60 i 90 min. Zależne od czasu inkubacji zmiany zawartości GnRH i Cu-GnRH w nadsącza i osadzie z podwzgórza/przysadki określano metodą RIA i HPLC.

Otrzymane wyniki wskazują, że cząsteczki GnRH i Cu-GnRH różnią się wrażliwością na degradację enzymatyczną. W podwzgórz natywny GnRH degraduje znacząco już po 15 min, podczas gdy kompleks Cu-GnRH pozostaje stabilny do 90 min inkubacji. Ponadto, analiza HPLC wskazuje na odmienny przebieg procesu degradacji tych cząsteczek: kompleks Cu-GnRH generował tylko jeden produkt degradacji, podczas gdy forma natywna GnRH rozłożyła się na osiem fragmentów.

Otrzymane wyniki dowodzą, że zmodyfikowanie struktury cząsteczki GnRH po jej skompleksowaniu z jonem miedzi prowadzi do zmniejszenia podatności kompleksu Cu-GnRH na enzymatyczną degradację w podwzgórz i przysadce. Kompleks Cu-GnRH może być uważany za stabilny i zdolny do dłuższego oddziaływania z receptorem analogon GnRH.

EKSPRESJA GENU RECEPTORA OREKSYNY TYPU 1 W PRZYSADCE MÓZGOWEJ ŚWIŃ W CZASIE CYKLU RUJOWEGO

OREXIN TYPE 1 RECEPTOR GENE EXPRESSION IN THE PORCINE PITUITARY GLAND DURING THE OESTROUS CYCLE

Anna Nitkiewicz^{1,2}, Nina Smolińska¹, Jadwiga Przła¹, Tadeusz Kamiński¹

¹*Katedra Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 1A, 10-957 Olsztyn; ²E-mail: a.nitkiewicz@gmail.com*

Oreksyny, określane jako hipokretyny, wywodzą się ze wspólnego prekursora prepro-oreksyny, zbudowanego ze 130 aminokwasów u człowieka i świni. Wyróżnia się dwa receptory oreksyn: typu I (OX1R) i typu II (OX2R). Ekspresję genów receptorów oreksyn stwierdzono w wielu różnych strukturach podwzgórza, przednim i tylnym płacie przysadki, tarczycy, nadnerczach, nerkach oraz w jajnikach i jądrach szczura. Przypuszcza się, że oreksyny mogą wpływać na homeostazę energetyczną organizmu, regulację łaknienia, snu i czuwania, a także na układ rozrodczy. Celem badań było porównanie ekspresji genu receptora oreksyny typu I (OX1R) w przednim i tylnym płacie przysadki w 10-12 oraz 14-16 dniu cyklu rujowego świni.

Ekspresję genu OX1R przeprowadzono metodą real-time PCR. Użyto w tym celu cDNA, powstałego na matrycy mRNA z wyizolowanych tkanek. Mieszanina reakcyjna zawierała polimerazę DNA AppliTaQ Gold, barwnik SYBR Green, mieszaninę dNTP, jony Mg²⁺ (SYBR[®] Green PCR Master Mix), oligonukleotydowe startery oraz cDNA. Każdą reakcję przeprowadzano w duplikatach stosując wstępną 10 minutową aktywację polimerazy DNA w 95°C, oraz powtarzaną przez 40 cykli 15 sekundową denaturację matrycy w 95°C i 1 minutowe przyłączanie starterów do matrycy w 59°C. Pozytywną kontrolę stanowiła ekspresja mRNA OX1R w bocznej części podwzgórza, natomiast kontrola negatywna przeprowadzona została z użyciem prób z wodą, zamiast cDNA. Jako standard (gen referencyjny) wykorzystano gen GAPDH. W celu potwierdzenia specyficzności otrzymanych produktów przygotowano krzywą dysocjacji, a dodatkowo powstałe amplikony poddano sekwencjonowaniu. Ponadto dla genu OX1R i GAPDH zostały sporządzone krzywe standardowe.

Stwierdzono ekspresję genu OX1R w przednim i tylnym płacie przysadki w 10-12 oraz 14-16 dniu cyklu rujowego świni. W tylnym płacie przysadki stwierdzono wyższą ($p=0,07$) ekspresję mRNA OX1R w 10-12 w porównaniu z 14-16 dniem cyklu. Natomiast nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w ekspresji genu OX1R w przednim płacie przysadki w obydwu badanych okresach. Porównanie ekspresji mRNA OX1R pomiędzy badanymi tkankami w 10-12 i 14-16 dniu cyklu wykazało wyższy poziom mRNA ($p \leq 0,001$) w przednim płacie przysadki. Homologia pomiędzy znaną z Banku Genów sekwencją genu OX1R, a otrzymanymi amplikonami wyniosła 99%.

Wykazanie zróżnicowanej ekspresji mRNA OX1R sugeruje możliwość wpływu oreksyn na przysadkę, a przez to ich udział w kontroli cyklu rujowego.

Praca wykonana w ramach Projektu Badawczego MNiSW Nr N N308 122134 (2008-2011 r.).

EKSPRESJA MRNA NPY I IMMUNOREAKTYWNEGO NEUROPEPTYDU Y W NEURONACH PODWZGÓRZA OWCY W OKRESIE DOJRZEWANIA PŁCIOWEGO. MOŻLIWE POŁĄCZENIA Z NEURONAMI SOMATOSTATYNOWYMI

EXPRESSION OF MRNA NPY AND IMMUNOREACTIVE NEUROPEPTIDE Y IN THE HYPOTHALAMIC NEURONS OF PREPUBERTAL SHEEP. POSSIBLE CONNECTIONS WITH SOMATOSTATIN-CONTAINING NEURONS

Jolanta Polkowska¹, Yves Tillet², Sophie Picard², Gilles. Bruneau², Anna Wójcik-Gładysz¹

¹ Instytut Fizjologii i Żywienia zwierząt im Jana Kielanowskiego PAN, o5-110 Jabłonna, j.polkowska@ifzz.pan.pl

² Controle Central de l'Ovulation UMR 6175 INRA/CNRS/Univ Tours/Haras nationaux, IFR135, 37380 Nouzilly, France

Cel pracy: Neurony produkujące neuropeptyd Y (NPY) w jądrze łukowatym podwzgórza (ARC), są potencjalnie włączone w kontrolę procesów rozrodczych u owcy, poprzez swój wpływ mediacyjny na sekrecję GnRH/LH w okresie cyklu płciowego. W okresie poprzedzającym uzyskanie dojrzałości płciowej (puberty), infuzje tego peptydu do 3-ciej komory mózgowej owcy stymulują zarówno syntezę jak i magazynowanie ale nie uwalnianie podjednostki β hormonu luteinizującego (LH). Z drugiej strony, w okresie pre-pubertalnym obserwuje się w jądrze ARC wzrost ekspresji genu dla pre-somatostatyny (PPS) oraz immunoreaktywnej (IR) somatostatyny. Sugeruje to możliwe uczestnictwo tego hormonu w procesach prowadzących do uzyskania puberty. Celem pracy było zbadanie, czy w okresie przejściowym pomiędzy wczesnym okresem pre-pubertalnym a około-pubertalnym występują zmiany w ekspresji mRNA NPY i IR NPY w neuronach ARC podwzgórza owcy. Badano również możliwe połączenia pomiędzy neuronami NPY i somatostatynowymi.

Materiały i metody: Doświadczenie przeprowadzono na dwóch grupach wiekowych niedojrzałych płciowo jagniąt płci żeńskiej rasy polski merynos.: 16-tygodniowe (n=14, grupa pre-pubertalna) i 32-tygodniowe (n=14, grupa około-pubertalna). Ekspresję mRNA NPY oznaczano metodą hybrydyzacji *in situ* z zastosowaniem anty-sensownej sondy znakowanej S³⁵. Ekspresję IR NPY i IR somatostatyny, badano przy pomocy metody immunohistochemicznej używając przeciwciał poliklonalnych. Obydwa reakcje analizowano w mikroskopie świetlnym przy pomocy komputerowego analizatora obrazu „Lucia” i wyrażono jako procent powierzchni zajmowanej przez materiał IR oraz gęstość optyczną materiału hybrydyzacyjnego i immunoreaktywnego. Połączenia między neuronami NPY i somatostatyny badano przy pomocy podwójnego barwienia immunohistochemicznego i analizowano w mikroskopie konfokalnym.

Wyniki: Wykazano, że ekspresja mRNA NPY w jądrze ARC, wyrażona przez gęstość optyczną materiału hybrydyzacyjnego była mniejsza w grupie jagniąt około-pubertalnych w porównaniu z grupą pre-pubertalną (P<001). Odwrotnie, ekspresja IR NPY wzrastała wraz z wiekiem jagniąt i obydwa mierzone parametry były wyższe w grupie około-pubertalnej w porównaniu z grupą pre-pubertalną (P<001). Analiza w mikroskopie konfokalnym wykazała istnienie połączeń pomiędzy IR włóknami nerwowymi NPY a perykarionami somatostatynowymi w ARC. Obserwowano również morfologiczne kontakty pomiędzy, włóknami somatostatynowymi a perykarionami NPY. Analiza tych kontaktów jest w trakcie opracowywania.

Wnioski: 1. Spadek syntezy mRNA NPY pomiędzy okresem pre- i około-pubertalnym wskazuje na stopniowe wykorzystywanie zapasów transkryptu zsyntetyzowanego wcześniej w okresie pre-pubertalnym, do syntezy peptydu potrzebnego w okresie późniejszym, około-pubertalnym. 2. Wzrastająca aktywność sekrecyjna neuronów NPY pomiędzy okresem pre- i około-pubertalnym sugeruje, że neurony te mogą być włączone w procesy prowadzące do uzyskania dojrzałości płciowej u owcy. 3. Istnienie połączeń pomiędzy neuronami NPY somatostatynowymi na różnych poziomach neuronalnych stanowi morfologiczną bazę do ich funkcjonalnej współpracy w przekazywaniu sygnałów transmisyjnych w okresie dojrzewania płciowego u owcy.

STĘŻENIE HORMONÓW TARCZYCY W PŁYNIE MÓZGOWO- RDZENIOWYM OWIEC W SEZONIE I POZA SEZONEM ROZRODCZYM

CONCENTRATION OF THYROID HORMONES IN THE SHEEP CEREBROSPINAL FLUID IN AND OUTSIDE THE NATURAL BREEDING SEASON

¹Janina Skipor, ²Tomasz Misztal, ¹Waldemar Grzegorzewski

¹Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie,

²Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN im. Kielanowskiego w Jabłonie

U owiec, podobnie jak u innych gatunków zwierząt rozmnażających się sezonowo, zakończenie okresu aktywności rozrodczej i przejście w okres bezruijowy – anestrus – wymaga obecności hormonów tarczycy. Wyniki najnowszych badań wskazują, że w procesie transformacji do anestrus istotną rolę może odgrywać dejodynaza typu II, enzym konwertujący przemianę prohormonu tyroksyny (T4) do aktywnej biologicznie formy trójiodotyroniny (T3). Stwierdzono, że aktywność tego enzymu w podwzgórzu i w komórkach wyściełających III komorę mózgu – tanycytach, u chomików, ulega sezonowym zmianom. Równie ważną rolę wydaje się odgrywać płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR), odpowiedzialny za transport hormonów tarczycy z krwi obwodowej do tanacytów. W dostępnej literaturze brakuje danych na temat stężenia T4 i T3, krążących w PMR owiec.

Cel badań: określenie stężenia całkowitej i wolnej frakcji tyroksyny (TT4 i fT4) i trójiodotyroniny (TT3 i fT3) w PMR u owiec w sezonie rozrodczym i anestrualnym.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono na samicach owiec (n=6) w wieku ok. 5 lat, którym chirurgicznie implantowano kaniulę do III komory mózgowej. Kolekcje PMR prowadzono w miesiącach aktywności rozrodczej - listopad i grudzień, oraz w miesiącach okresu anestrualnego - kwiecień i maj. PMR pobierano z prędkością 20 μ l/min, przez 3 godziny, przy pomocy pompy mikroinfuzyjnej. Próbkę krwi pobrano przed rozpoczęciem i po zakończeniu kolekcji PMR. Stężenie hormonów tarczycy w PMR i w osoczu oznaczano za pomocą zestawów RIA-gnost® fT3, TT3, fT4, TT4 firmy Cisbio.

Wyniki. Średnie ($\pm$ SEM) stężenie TT3 w PMR w listopadzie i grudniu wynosiło odpowiednio $11,2 \pm 1,1$ i $19,3 \pm 2,3$ pg/ml, natomiast w kwietniu i maju odpowiednio $13 \pm 2,0$ i $13,2 \pm 1,1$ pg/ml. Stężenie fT3 układało się na poziomie $0,6 \pm 0,05$ pg/ml w listopadzie i grudniu oraz $0,6 \pm 0,06$ i $0,5 \pm 0,06$ pg/ml odpowiednio w kwietniu i maju.

Stężenie TT4 w PMR w listopadzie i grudniu wynosiło odpowiednio $1,5 \pm 0,1$ i $1,6 \pm 0,1$ ng/ml, a w kwietniu i maju, odpowiednio $1,2 \pm 0,1$ i $1,5 \pm 0,1$ ng/ml. Stężenie fT4 w tych miesiącach wynosiło odpowiednio $16,9 \pm 1,6$ i $9,8 \pm 1,6$ pg/ml oraz $13,8 \pm 5,1$ i $13,6 \pm 6,3$ pg/ml.

W porównaniu do stężenia w krwi obwodowej poziom TT3 i TT4 w PMR był odpowiednio 48 i 49 razy niższy. Natomiast poziom fT3 w PMR był około 4 razy niższy niż stwierdzany w tym czasie w osoczu krwi. Stężenie fT4 w PRM i osoczu krwi było zbliżone w obu badanych okresach. Badania finansowano ze środków projektu badawczego N308 020 31/1984

SEZONOWOZALEŻNY WPŁYW PROLAKTYNY I MELATONINY NA WYDZIELANIE LEPTYNY Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ OWIEC - BADANIA *IN VITRO*

SEASONAL-DEPENDENT EFFECT OF PROLACTIN AND MELATONIN ON LEPTIN SECRETION FROM OVINE ADIPOSE TISSUE – *IN VITRO* STUDY

Małgorzata Szczęsna, Beata Klocek-Górka, Dorota A. Zięba

*Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Katedra Hodowli Owiec i Kóz,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, e-mail: gochaw@o2.pl*

Cel pracy: Tkanka tłuszczowa, oprócz pełnienia funkcji rezerwuaru zasobów energetycznych, jest również ważnym narządem endokrynnym. Poprzez sekrecję specyficznego hormonu – leptyny, bierze udział w regulacji szeregu procesów zachodzących w organizmie. Prolaktyna oddziałująca na metabolizm może również wpływać na aktywność tkanki tłuszczowej. Sugeruje się, że zmieniająca się długość dnia i związane z tym zmiany w koncentracji melatoniny, nie tylko wpływają na ekspresję i sekrecję leptyny oraz prolaktyny, ale także są w stanie modyfikować ich wzajemne oddziaływanie. Celem przeprowadzonych doświadczeń było prześledzenie oddziaływania egzogennej prolaktyny oraz melatoniny na wydzielanie leptyny z eksplantów owczej tkanki tłuszczowej inkubowanej w warunkach *in vitro*, a także określenie roli fotoperiodu w kształtowaniu tych oddziaływań.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły fragmenty okołonerkowej tkanki tłuszczowej pobrane od 15 maciorek rasy polska owca długowłnista. Doświadczenia prowadzono w dwóch sezonach: w okresie długiego-LD (maj, lipiec; 6 owiec) i krótkiego-SD (wrzesień, październik, listopad; 9 owiec) dnia. Eksplanty o masie 100mg inkubowano przez 5 godzin (95% wilgotności, 5% CO₂, 37°C), w pożywce Eagle'a. Po czasie niezbędnym do ekwilibracji, w 120 minucie, do inkubowanych tkanek dodano odpowiednią kombinację następujących hormonów: hodowle bez dodatku (kontrola), insulina (100 ng/ml), prolaktyna (100 ng/ml), prolaktyna (300 ng/ml), insulina (100 ng/ml) + prolaktyna (100 ng/ml), insulina (100 ng/ml) + prolaktyna (300 ng/ml) – każda z kombinacji w wersji z dodatkiem (500 µg/ml) lub bez dodatku melatoniny. Próby podłoża pobierano co pół godziny. Zebrane próbki zamrażano i przechowywano w temp. -20°C do momentu oznaczeń zawartości leptyny metodą RIA.

Wyniki: W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano statystycznie istotne ($P < 0,01$) obniżenie wydzielania leptyny pod wpływem wyższej dawki prolaktyny w okresie SD, ale nie w LD. Melatonina obniżała stymulowaną insuliną sekrecję leptyny bez względu na sezon. Wpływ długości dnia odnotowano w przypadku oddziaływania melatoniny w interakcji z insuliną i PRL (100 ng/ml), kiedy to dodatek melatoniny w SD istotnie stymulował wydzielanie leptyny, podczas gdy w LD wykazywał tendencje do jej obniżania. Ponadto, w okresie krótkiego dnia, dodatek melatoniny znosił hamujące działanie PRL. W badaniach, wykazano, że aktywność owczych adipocytów w warunkach *in vitro* zmienia się w ciągu roku. Podstawowy poziom wydzielania leptyny był najniższy w maju ($185,8 \pm 76,0$ pg/ml), a najwyższy w październiku, osiągając wartości czterokrotnie wyższe ($806,1 \pm 183,8$ pg/ml).

Wnioski: Prolaktyna może oddziaływać na wydzielanie leptyny z eksplantów owczej tkanki tłuszczowej, przy czym efekt ten uzależniony jest od długości dnia. Uzyskane wyniki wskazują na istnienie interakcji pomiędzy prolaktyną, melatoniną a aktywnością tkanki tłuszczowej, a także potwierdzają modulujący wpływ fotoperiodu na kształtowanie tych oddziaływań.

WPŁYW JAJNIKOWYCH HORMONÓW STEROIDOWYCH NA GONADOTROPOWE PARAMETRY ROZPOCZĘCIA MECHANIZMÓW PŁCIOWYCH DOJRZEWANIA SOMATYCZNEGO U SAMICY OWCY

THE INFLUENCE OF THE OVARIAN STEROID HORMONES ON THE GONADOTROPHIC PARAMETERS OF AN INAUGURATION OF SEXUAL MECHANISMS OF THE SOMATIC MATURATION IN THE EWE

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

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna,
e-mail: m.wankowska@ifzz.pan.pl*

Na proces dojrzewania somatycznego składają się mechanizmy postnatalnego wzrostu i rozwoju prowadzące do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Pierwsza połowa rozwoju postnatalnego owcy, to kluczowy etap ontogenezy polegający na wprowadzeniu jagnięcia w okres juwenilny. Neuroendokrynowe mechanizmy integrujące procesy dojrzewania somatycznego u samicy owcy prowadzą do zakończenia okresu dojrzewania wzrostowego w przełomowym okresie infantylno-juwenilnym i rozpoczęcia okresu dojrzewania płciowego 15 tygodni później. Mechanizmy rozwoju płciowego są uwarunkowane koordynacją sekrecji hormonu luteinizującego (LH) i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (FSH), działają w gruczole przysadki mózgowej oraz mają charakter histomorfologiczny. Kluczową rolę w tej koordynacji odgrywają ośrodkowy czynnik – gonadoliberyna (GnRH) i gonadowe hormony steroidowe.

Cel pracy: Celem pracy było opisanie procesów sekrecji w komórkach gonadotropowych na początku okresu juwenilnego ontogenezy, obserwowanych u jagniąt będących w stanie normy fizjologicznej w porównaniu z jagniętami pozbawionymi wpływu sprzężenia zwrotnego steroidów gonadowych pod koniec okresu infantylnego ontogenezy.

Materiał i Metody: Samice owcy rasy Polska długowłnista (n=8) podzielono na dwie grupy. Wyodrębniono grupę doświadczalną, zwierząt z usuniętymi jajnikami w 12. tygodniu życia oraz grupę zwierząt w stanie normy fizjologicznej. Materiały uzyskane w wyniku kolekcji krwi obwodowej w 12. i 16. tygodniu życia oraz dysekcji po dekapitacji w 16. tygodniu życia, zanalizowano za pomocą następujących metod: 1. immunohistochemicznego (IHC) oznaczania hormonów i/lub receptorów w wyniosłości pośredkowej (GnRH) i części dystalnej przysadki mózgowej (LH, FSH, receptory estradiolowe α (ER α); podwójne barwienie: LH/ER α , FSH/ER α), 2. hybrydohistochemicznego (HHC) oznaczania mRNA dla podjednostek LH β i FSH β (hybrydyzacja *in situ*), 3. radioimmunologicznego oznaczania stężenia hormonów (LH, FSH) w osoczu krwi oraz 4. jakościowej (opisowej) i ilościowej analizy obrazu histologicznego.

Wyniki: Populacja zakończeń nerwowych w wyniosłości pośredkowej, immunoreaktywnych dla GnRH, była niższa u zwierząt z usuniętymi gonadami w porównaniu z jagniętami z grupy kontrolnej (p<0.01). Obserwowano większe stężenie LH we krwi obwodowej oraz większą populację gonadotropów wybarwionych metodą IHC dla podjednostki LH β i LH β /ER α oraz metodą HHC dla mRNA LH β u jagniąt z usuniętymi jajnikami w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej (p<0.05). Stężenie LH u zwierząt kontrolnych pozostawało na podobnym poziomie w 12. i 16. tygodniu życia. Uderzająco większemu stężeniu FSH we krwi obwodowej (p<0.001) i większej liczbie gonadotropów wybarwionych metodą HHC dla mRNA FSH β (p<0.05) nie towarzyszyły istotne zmiany dotyczące komórek immunoreaktywnych dla FSH β i FSH β /ER α u jagniąt z usuniętymi jajnikami w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej. Stężone FSH u zwierząt kontrolnych wzrosło od 12. do 16. tygodnia życia (p<0.01).

Wnioski: Działanie steroidów gonadowych na parametry gonadotropowe rozpoczęcia okresu juwenilnego u samicy owcy polega na: hamowaniu uwalniania GnRH do podwzgórzowo-przysadkowego układu wrotnego oraz wstrzymywaniu potranskrypcyjnych procesów sekrecji LH i FSH w gruczole przysadki mózgowej.

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

WPLYW JĄDROWYCH HORMONÓW STEROIDOWYCH NA GONADOTROPOWE PARAMETRY INAUGURACJI DOJRZEWANIA PŁCIOWEGO U SAMCA OWCY

THE INFLUENCE OF THE TESTICULAR STEROID HORMONES ON THE GONADOTROPHIC PARAMETERS OF AN INAUGURATION OF SEXUAL MATURATION IN THE RAM

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

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna,
e-mail: m.wankowska@ifzz.pan.pl*

Na proces dojrzewania somatycznego składają się mechanizmy postnatalnego wzrostu i rozwoju prowadzące do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Pierwsza połowa rozwoju postnatalnego owcy, to kluczowy etap ontogenezy polegający na wprowadzeniu jagnięcia w okres juwenilny, który prowadzi do rozpoczęcia u samców procesu dojrzewania płciowego tuż po 15. tygodniu życia; u samic ten proces rozpoczyna się 15 tygodni później. Mechanizmy dojrzewania płciowego są uwarunkowane koordynacją sekrecji hormonu luteinizującego (LH) i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (FSH) w obrębie gruczołu przysadki mózgowej, a kluczową rolę w tej koordynacji odgrywają ośrodkowy czynnik – gonadoliberyna (GnRH) i gonadowe hormony steroidowe.

Cel pracy: Celem pracy było opisanie procesów sekrecji w subpopulacjach komórek endokrynowych przysadki mózgowej, syntetyzujących LH i FSH, na początku okresu dojrzewania płciowego, obserwowanych u samców owcy będących w stanie normy fizjologicznej w porównaniu z jagniętami pozbawionymi wpływu sprzężenia zwrotnego steroidów jądrowych pod koniec okresu infantylnego ontogenezy.

Materiał i Metody: Samce owcy rasy Polska długowiełnista (n=8) podzielono na dwie grupy. Wyodrębniono grupę doświadczalną, zwierząt z usuniętymi jądrami w 12. tygodniu życia oraz grupę zwierząt w stanie normy fizjologicznej. Do obróbki materiałów uzyskanych w wyniku kolekcji krwi obwodowej w 12. i 16. tygodniu życia oraz dysekcji po dekapitacji w 16. tygodniu życia, zastosowano następujące metody: 1. immunohistochemiczne (IHC) oznaczanie hormonów i/lub receptorów w wyniosłości pośrodkowej (GnRH) i przysadce mózgowej (LH, FSH, receptory estradiolowe α (ER α); podwójne barwienie: LH/ER α , FSH/ER α), 2. hybrydohistochemiczne (HHC) oznaczanie mRNA dla podjednostek LH β i FSH β (hybrydyzacja *in situ*) w przysadce mózgowej, 3. radioimmunologiczne oznaczanie stężenia hormonów (LH, FSH, testosteronu) w osoczu krwi, 4. analiza parametrów pulsacyjnego uwalniania hormonów, 5. Jakościowa i ilościowa analiza obrazu histologicznego.

Wyniki: Populacja zakończeń nerwowych w wyniosłości pośrodkowej, immunoreaktywnych dla GnRH, była niższa u zwierząt z usuniętymi gonadami w porównaniu z jagniętami z grupy kontrolnej (p<0.01). Obserwowano większe stężenie LH we krwi obwodowej (p<0.001) oraz większą populację gonadotropów wybarwionych metodą IHC dla podjednostki LH β i LH β /ER α oraz metodą HHC dla mRNA LH β (p<0.05) u jagniąt z usuniętymi jądrami w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej. W przypadku FSH, uderzająco większemu stężeniu hormonu we krwi obwodowej (p<0.001) towarzyszyła mniejsza liczba gonadotropów wybarwionych metodą IHC dla podjednostki FSH β i FSH β /ER α oraz większa liczba gonadotropów wybarwionych metodą HHC dla mRNA FSH β (p<0.01) u jagniąt z usuniętymi jądrami w porównaniu ze zwierzętami z grupy kontrolnej. Stężenie LH, FSH zmniejszyło się, podczas gdy testosteronu zwiększyło się, pomiędzy 12. a 16. tygodniem życia u zwierząt kontrolnych (p<0.001).

Wnioski: Działanie steroidów gonadowych na parametry gonadotropowe rozpoczęcia okresu dojrzewania płciowego u samca owcy polega na: hamowaniu uwalniania GnRH do podwzgórzowo-przysadkowego układu wrotnego, stymulowaniu potranskrypcyjnych procesów syntezy i akumulacji FSH kosztem jego uwalniania oraz wstrzymywaniu potranskrypcyjnych procesów uwalniania LH w gruczole przysadki mózgowej.

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

POSTNATALNY WPŁYW GONADOWYCH HORMONÓW STEROIDOWYCH NA SOMATOTROPOWE PARAMETRY ONTOGENETYCZNEGO PRZEŁOMU INFANTYLNO/JUWENILNEGO U JAGNIĄT RÓŻNEJ PŁCI

THE POSTNATAL INFLUENCE OF THE GONADAL STEROID HORMONES ON THE SOMATOTROPHIC PARAMETERS OF ONTOGENIC INFANTILE/JUVENILE SHIFT IN LAMBS OF DIFFERENT SEXES

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

*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna,
e-mail: m.wankowska@ifzz.pan.pl*

Na proces dojrzewania somatycznego składają się mechanizmy postnatalnego wzrostu i rozwoju prowadzące do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Pierwsza połowa rozwoju postnatalnego owcy, pokrywająca się z okresem odchowu przy matce, trwającym ok. 100 dni, to kluczowy etap ontogenezy polegający na intensywnym wzroście i wprowadzeniu jagnięcia w okres juwenilny. W procesach wzrostowych przejściowego etapu infantylno-juwenilnego u owcy ważną rolę odgrywa podwzgórzowo-przysadkowy układ somatostatyna-hormon wzrostu (GH). Porównano procesy: neurosekrecji somatostatyny z zakończeń neuronów w wyniosłości pośredkowej, akumulacji i sekrecji GH oraz receptywności gruczołu przysadki mózgowej i subpopulacji komórek somatotropowych dla estradiolu na początku okresu juwenilnego ontogenezy u owiec różnej płci w stanie normy fizjologicznej i pozbawionych wpływu sprzężenia zwrotnego steroidów gonadowych pod koniec okresu infantylnego ontogenezy.

Cel pracy: Celem pracy było opisanie natury neuroendokrynowego mechanizmu efektorowego procesów wzrostowych dojrzewania somatycznego w podwzgórzowo-przysadkowym układzie somatostatyna-GH na początku okresu dojrzewania płciowego, u jagniąt różnej płci będących w stanie normy fizjologicznej w porównaniu z jagniętami pozbawionymi wpływu sprzężenia zwrotnego steroidów gonadowych pod koniec okresu infantylnego ontogenezy.

Materiał i Metody: Samce i samice owcy rasy Polska długowielista ($n=16$) podzielono na dwie grupy. Wyodrębniono grupę doświadczalną, zwierząt z usuniętymi gonadami w 12. tygodniu życia oraz grupę zwierząt w stanie normy fizjologicznej. Do zbadania materiałów uzyskanych w wyniku kolekcji krwi obwodowej w 12. i 16. tygodniu życia oraz dysekcji po dekapitacji w 16. tygodniu życia, zastosowano następujące metody: 1. immunohistochemiczne oznaczanie hormonów i/lub receptorów w wyniosłości pośredkowej (somatostatyna) i części dystalnej przysadki mózgowej (GH, receptory estradiolowe α ($ER\alpha$); podwójne barwienie: GH/ $ER\alpha$), 2. radioimmunologiczne oznaczanie stężenia GH w osoczu krwi, 4. analiza parametrów pulsacyjnego uwalniania GH, 5. jakościowa (opisowa) i ilościowa (morfometryczna) analiza obrazu histologicznego.

Wyniki: Populacja zakończeń nerwowych w wyniosłości pośredkowej, immunoreaktywnych dla somatostatyny, była niższa u zwierząt różnej płci z usuniętymi gonadami w porównaniu z jagniętami z grup kontrolnych ($p<0.05$). Populacja komórek somatotropowych immunoreaktywnych dla GH i GH/ $ER\alpha$ zwiększyła się u samic z usuniętymi jajnikami i zmniejszyła się u samców z usuniętymi jądrami w porównaniu z jagniętami z grup kontrolnych ($p<0.05$). Zawartość GH we krwi obwodowej była niższa u jagniąt różnej płci z usuniętymi gonadami w porównaniu z jagniętami z grup kontrolnych ($p<0.01$). Stężenie GH u samic z grupy kontrolnej wzrosło od 12. do 16. tygodnia życia ($p<0.05$), a u samców pozostawało na porównywalnym poziomie w obu grupach wiekowych.

Wnioski: Działanie steroidów gonadowych na parametry somatotropowe przełomowego okresu infantylno/juwenilnego u owcy polega na: hamowaniu uwalniania somatostatyny do podwzgórzowo-przysadkowego układu wrotnego, stymulowaniu endokrynowych procesów wzrostowych dojrzewania somatycznego na poziomie akumulacji i uwalniania GH u samców a u samic na hamowaniu akumulacji i stymulowaniu uwalniania GH.

BIĄŁKO ROŚLINNE W HODOWLI KOMÓREK SOMATYCZNYCH

PLANT PROTEIN IN CULTURE OF SOMATIC CELLS

Jolanta Opiela¹, Michał Bochenek¹, Bożenna Ryńska¹, Edyta Kopeć², Lucyna Kątska-Książkiewicz^{1,2},
Zdzisław Smorąg¹

¹*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki- PIB, Balice; e-mail: jopiel@izoo.krakow.pl*

²*Zamiejscowy Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski*

W ostatnich latach podejmowane są próby zastąpienia białkiem roślinnym surowicy pochodzenia zwierzęcego lub pochodnych surowicy np. albuminy jako składnika pożywek do hodowli komórek somatycznych, a także jako składnika innych pożywek stosowanych w biotechnologii rozrodu zwierząt. Powodem jest niejednoznaczny wpływ surowicy na jakość hodowanych komórek. Z sanitarnego punktu widzenia białko roślinne jest znacznie bezpieczniejszym komponentem w porównaniu do białka zwierzęcego. Ponadto jest białkiem o jednorodnym, powtarzalnym składzie, co warunkuje standaryzację hodowli.

Celem badań było wykazanie wpływu stężenia białka roślinnego (PP) w medium na hodowane in vitro fibroblasty bydłowe. Hodowle fibroblastów prowadzono w pożywce DMEM uzupełnionej 1. 10% FCS 2. białkiem roślinnym (PP) o stężeniu 0,1%, 0,2%, 0,4%, 1%, 2%, 4% i 6%. Trzecią grupę stanowiła kontrola gdzie komórki hodowano w pożywce DMEM bez uzupełnienia. Po czterech dniach hodowli obliczano tempo proliferacji fibroblastów oraz cytometrycznie oceniano integralność błony komórkowej stosując barwniki Sybr 14 i jodek propidyny (PI). Hodowle przeprowadzono w co najmniej 3-ech powtórzeniach.

Najwyższe tempo proliferacji fibroblastów oraz ich wysoką jakość stwierdzono hodując je w pożywce DMEM uzupełnionej 10% FCS. Stosując te same kryteria dla mediów uzupełnionych PP stwierdzono, iż optymalne warunki hodowli występują w przypadku 2% stężenia tego białka w pożywce. Uzyskane w tym przypadku rezultaty, chociaż niższe niż w grupie 1, były wyższe niż w grupie kontrolnej.

Otrzymane wyniki wskazują, że dodatek PP w stężeniu 2% może do pewnego stopnia zastąpić dodatek FCS do medium. Biorąc jednak pod uwagę, że uzyskane rezultaty były niższe od tych jakie obserwowano hodując fibroblasty w pożywce uzupełnionej FCS, poszukiwanie bardziej efektywnych rozwiązań hodowli wymaga dalszych badań.

BADANIE WYBRANYCH CECH NASIENIA KNURÓW TRANSGENICZNYCH

EXAMINATION OF SOME STANDARD PARAMETERS OF TRANSGENIC BOARS' SEMEN

Barbara Szczęśniak-Fabiańczyk¹, Barbara Gajda¹, Ryszard Słomski², Zdzisław Smorąg¹, Stanisław Gerepka³, Waldemar Kowalski³, Mirosław Koska³

¹ Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki - PIB, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice,
e-mail: bfabianc@izoo.krakow.pl

² Instytut Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,

³ Stacja Badawcza Trzody Chlewnej, Sp. z o.o. Żerniki Wielkie, 55-020 Żórawina.

Celem pracy była ocena jakości nasienia knurów transgenicznych dla genu fukozylotransferazy człowieka.

Badania przeprowadzono na 6 knurach transgenicznych pokolenia F1 i F2 oraz 3 knurach nietransgenicznych (2 pbz, 1 wbp). Wiek knurów wahał się w przedziałach od 11-28 miesięcy w grupie doświadczalnej i 8-32 miesięcy w grupie kontrolnej. Nasienie pobierano raz w miesiącu i oceniano następujące jego parametry: objętość ejakulatu, koncentrację, ruchliwość, osmolowość, pH oraz morfologię plemników. Ponadto sprawdzano podatność na konserwację - nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikami komercyjnymi BTS i przechowywano w temperaturze ok. +15 °C.

Oceniono łącznie 18 ejakulatów pochodzących od knurów transgenicznych (od 1 do 6 ejakulatów od knura) i 29 ejakulatów pochodzących od knurów nietransgenicznych (11 i 6 ejakulatów od knurów pbz i 12 ejakulatów od knura wbp). Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Cechy nasienia knurów transgenicznych i nietransgenicznych (czystorasowych)

Cechy	Knury transgeniczne			Knury nietransgeniczne		
	Średnie	Wartości min.	max.	Średnie	Wartości min.	max.
Objętość ejakulatu (ml)	169,4	80	230	203,8	120	350
Koncentracja (tyś/mm ³)	416,9	199	637	412,6	272	597
Ruchliwość po pobraniu (%)	67,5	40	80	73,6	5	90
Osmolowość	323,2	301	341	319,1	303	344
pH	7,63	7,39	7,98	7,70	7,47	8,05
Ocena morfologiczna:						
plemniki normalne (%)	70,8	18,6	97,2	67,7	9,3	99,0
plemniki z wadami głównymi (%)	11,1	1,0	63,2	8,5	0,0	26,6
plemniki z wadami podrzędnymi (%)	18,1	1,4	54,0	23,8	1,0	64,1
Podatność na konserwację:						
ruchliwość po 1 dniu (%)	56,1	15	90	56,3	5	80
ruchliwość po 4 dniach (%)	45,0	5	75	46,7	0	70
ruchliwość po 7 dniach (%)	33,1	0	65	42,1	0	65
przeżywanie (dni)	6,4	0	18	8,2	0	15

Stwierdzono, że badane parametry nasienia knurów transgenicznych nie odbiegają od obserwowanych u knurów nietransgenicznych w tej samej grupie wiekowej.

OCENA KOMPETENCJI ROZWOJOWYCH ZARODKÓW ŚWINI UZYSKANYCH PO INSEMINACJI NASIENIEM KNURÓW TRANSGENICZNYCH I NIETRANSGENICZNYCH

EXAMINATION OF QUALITY OF PREIMPLANTATION PORCINE EMBRYOS OBTAINED AFTER INSEMINATION WITH TRANSGENIC AND NON-TRANSGENIC BOARS' SEMEN

Magdalena Bryła, Monika Trzcińska, Barbara

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki-PIB, Balice
e-mail: mbryla@izoo.krakow.pl

Celem przeprowadzonych doświadczeń była analiza zmian apoptotycznych w ekspandujących blastocystach uzyskanych *in vivo* po inseminacji nasieniem 3 knurów transgenicznych i 3 nietransgenicznych w oparciu o dwie metody molekularne: a) metodą TUNEL polegającą na wbudowywaniu znakowanych nukleotydów d-UTP sprzężonych z fluoresceiną w miejscach pęknięć DNA; b) analizę aktywności kaspazy -3 za pomocą zestawu PhiPhiLuxG₂D₂. Ogółem przebadano 180 zarodków w stadium blastocysty ekspandującej. Analiza metodą TUNEL zarodków po inseminacji nasieniem knurów transgenicznych i nietransgenicznych nie wykazała istotnych statystycznie różnic w ilości jąder apoptotycznych- indeks apoptotyczny odpowiednio 2.9 i 3.2%. Aktywność kaspazy -3 w zarodkach uzyskanych po inseminacji nasieniem knurów transgenicznych i nietransgenicznych stwierdzono odpowiednio w 5 i 4.5% zarodków na poziomie niskim oraz 33 i 29% zarodków na poziomie wysokim. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi zarodkami. Jednocześnie zaobserwowano pozytywną korelację ($r=0.962$) pomiędzy aktywnością kaspazy-3 a fragmentacją DNA w badanych blastocystach świni.

MODYFIKACJE OOCYTÓW I ZARODKÓW ŚWINI DLA CELÓW BIOTECHNOLOGICZNYCH

MODIFYING PORCINE OOCYTES AND EMBRYOS: IMPLICATIONS FOR BIOTECHNOLOGY

Barbara Gajda

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Krakowska 1
32-083 Balice/Kraków, e-mail: bgajda@izoo.krakow.pl*

Oocyty i zarodki ssaków posiadają własną gatunkową specyfikę. Typowym przykładem są oocyty i zarodki świni, które na tle innych gatunków ssaków, charakteryzują się wysoką zawartością związków tłuszczowych zgromadzonych w cytoplazmie głównie w postaci kropli lipidowych. Krople lipidowe składają się z mieszaniny różnych typów lipidów otoczonych pojedynczą warstwą fosfolipidów o zróżnicowanym składzie. Zawarte w kroplach lipidy stanowią element struktury błony komórkowej oraz cytoplazmy, jak również pełnią ważną rolę jako źródło energii niezbędne do prawidłowego rozwoju komórki jajowej. Jednak z punktu widzenia kriokonserwacji ich obecność w komórkach zarodkowych jest niekorzystna.

W referacie przedstawione są aktualne możliwości modyfikacji oocytów i zarodków świni między innymi za pomocą czynników fizycznych takich jak wirowanie czy zwiększone ciśnienie, chemicznych takich jak cytochalazyna B czy D, jak też manipulacji mikrochirurgicznych czy hodowli in vitro oraz implikacje biotechnologiczne tych zabiegów.

OCENA JAKOŚCI KLONALNYCH ZARODKÓW ŚWINI W OPARCIU O PRZYŻYCIOWĄ ANALIZĘ FLUORYCYTOCHEMICZNĄ ZMIAN PROAPOPTOTYCZNYCH

EVALUATION OF THE QUALITY OF PORCINE CLONED BLASTOCYSTS USING VITAL FLUORYCYTOCHEMICAL ANALYSIS FOR PROAPOPTOTIC CHANGES

Marcin Samiec¹, Maria Skrzyszowska

*Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy,
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice/Kraków; ¹E-mail: msamiec@izoo.krakow.pl*

Celem badań była ocena jakości blastocyst klonalnych świni na podstawie przyżyciowej diagnostyki fluorescencyjnej zmian proapoptotycznych w błonie plazmatycznej komórek. Dojrzałe *in vitro*, enukleowane oocyty świni rekonstruowano z jąder nieapoptotycznych komórek fibroblastycznych przy wykorzystaniu elektrofuzji. Do stymulacji zrekonstruowanych oocytów stosowano metodę sekwencyjnej aktywacji fizyko-chemicznej (SA_{F-Ch}). Pierwszy etap stanowiła równoczesna fuzja i aktywacja elektryczna (F_E/A_E) zrekonstruowanych oocytów przy użyciu dwóch generowanych bezpośrednio po sobie impulsów prądu stałego o natężeniu pola elektrostatycznego 1,2 kV/cm i czasie trwania 60 µsek każdy. W drugim etapie przeprowadzono dwustopniową aktywację chemiczną, którą inicjowano z 1,5-2-godzinnym opóźnieniem czasowym w stosunku do pierwszego etapu F_E/A_E zrekonstruowanych oocytów. Po 5-7-minutowej inkubacji w roztworze jonomycyny wapnia o stężeniu 15 µM/L, zrekonstruowane oocyty umieszczano na okres 3 godzin w pożywce z dodatkiem 10 µg/mL cykloheksimidu, a następnie hodowano *in vitro* przez 6-7 dni do osiągnięcia stadium moruli/blastocysty. Uzyskane blastocysty oceniano pod kątem obecności zmian proapoptotycznych w plazmolemie komórek wężła zarodkowego i/lub trofoblastu przy wykorzystaniu koniugatu diagnostycznego aneksyny V-eGFP. Ogółem zrekonstruowano 251 enukleowanych oocytów z jąder komórkowych nieapoptotycznych fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników (Grupa I) i 222 - z jąder fibroblastów płodowych (Grupa II). Do hodowli *in vitro* wyselekcjonowano 210/251 (83,7%) oraz 197/222 (88,7%) zrekonstruowanych oocytów, odpowiednio w Grupie I oraz II. W Grupach I oraz II uzyskano, odpowiednio, 119/210 (56,7%) i 144/197 (73,1%) dzielących się zarodków, w tym do stadium moruli i blastocysty rozwinęło się, odpowiednio, 91/210 (43,3%) i 29/210 (13,8%) oraz 113/197 (57,4%) i 45/197 (22,8%) zrekonstruowanych zarodków. Udział blastocyst, w których stwierdzono obecność komórek pozytywnie wyznakowanych aneksyną V-eGFP, utrzymywał się na poziomie 34,5% (10/29) oraz 37,8% (17/45), odpowiednio w Grupie I i II. Reasumując, przyżyciowa analiza fluorescencyjna blastocyst klonalnych świni wykazała, że sekwencyjna aktywacja fizyko-chemiczna oocytów zrekonstruowanych z jąder komórkowych fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników skutkowała nieznacznie niższym odsetkiem zarodków z proapoptotycznymi zmianami komórek w porównaniu do subpopulacji oocytów zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych. Niemniej jednak, w wyniku zastosowania metody SA_{F-Ch} do stymulacji zrekonstruowanych oocytów, kompetencje jąder komórkowych nieapoptotycznych fibroblastów płodowych do pokierowania rozwojem *in vitro* zarodków klonalnych świni były wyższe niż kompetencje jąder fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników.

DOJRZEWANIE IN VITRO OOCYTÓW LUDZKICH (IVM): ASPEKTY PODSTAWOWE I ZASTOSOWANIE KLINICZNE

IN VITRO MATURATION OF HUMAN OOCYTES (IVM): BASIC ASPECTS AND CLINICAL APPLICATION

Ricardo Faundez^{1,2}, Tomasz Rokicki¹

¹InviMed, Europejskie Centrum Macierzyństwa, Warszawa, ²Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu, Katedry Nauk Klinicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie, ricardo_faundez@sggw.pl

Dojrzewanie oocyty stanowi istotną część procesów prowadzących do powstania zarodka po zapłodnieniu. Prawdopodobieństwo dojrzewania przesądza o normalnym rozwoju zarodka, przebiegu implantacji i dalszym rozwoju płodu. Proces dojrzewania oocyty obejmuje dojrzewanie jądrowe, cytoplazmatyczne i epigenetyczne. Jednym z celów wykładu jest przybliżenie aktualnych danych wyjaśniających podstawowe mechanizmy dojrzewania oocytów. Wyjaśnienie istoty tych mechanizmów ma istotne znaczenie dla ustalenia optymalnych warunków do indukcji dojrzewania oocytów ludzkich *in vitro* (IVM). Dojrzewanie *in vitro* to jedna z nowszych technik wspomaganego rozrodu. Pobranie niedojrzałych oocytów od małych pęcherzyków a następnie poddanie ich dojrzewaniu *in vitro* jest dobrą alternatywą dla zabiegu zapłodnienia poza ustrojowego (IVF), przy którym konieczna jest stymulacja hormonalna pacjentek. Stymulacja ta wiąże się jednak z wysokim kosztem hormonów oraz problemami zdrowotnymi, które mogą wystąpić podczas jej stosowania. IVM znajduje się jeszcze na etapie udoskonalenia ze względu na skromne wyniki embriologiczne i stosunkowo niski odsetek ciąż. Stwierdzono istotny wzrost odsetka dojrzewania oocytów, implantacji i ciąży po dodaniu do medium hodowlanego surowicy pacjentki. Zawarte w surowicy różne czynniki wzrostowe takie jak: naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β) lub insulinopodobny czynnik wzrostu-I (IGF-I) biorą udział w dojrzewaniu cytoplazmatycznym oocyty. Sugerowano, że obecność FSH i hCG w mediach do dojrzewania również ma korzystny wpływ na ten proces, jednak ostatnio wykazano, że ekspozycja oocytów izolowanych od pacjentów z zespołem PCO na hCG podczas ich dojrzewania *in vitro* nie polepsza odsetku dojrzewania ani potencjału rozwojowego oocytów. Ostatnio, ze względu na zalecenia definiowania mediów do hodowli i unikania stosowania surowicy, podjęto również badania w celu udoskonalenia mediów do IVM. Mimo postępów w tej dziedzinie liczne badania zademonstrowały, iż oocyty po IVM nie mają tej samej rozwojowej zdolności, co oocyty dojrzałe *in vivo*. Bez względu na to czy stosuje się egzogenną stymulację hormonalną czy nie, należy pamiętać, iż konieczne do uzyskania pełnego potencjału rozwojowego oocytów zdarzenia podczas dojrzewania zachodzą wewnątrz pęcherzyków jajnikowych. W niniejszym wykładzie również przedstawione zostaną wyniki zabiegów IVM, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCO), przeprowadzone w naszej klinice. Wyniki przez nas uzyskane potwierdzają pogląd, iż technika IVM jest skuteczną metodą leczenia pacjentek z zespołem PCO. Planujemy również pierwsze próby zastosowania IVM połączonego z witrifikacją oocytów, co mogłoby być pomocne dla zachowania płodności u kobiet z chorobą nowotworową. Dojrzewanie ludzkich oocytów *in vitro* jest techniką, która w przyszłości może odgrywać wielką rolę, a mianowicie może stać się standardową metodą stosowaną w leczeniu niepłodności u ludzi. Osiągnięcie tego celu wymaga jednak zapewnienia prawidłowego dojrzewania cytoplazmatycznego i jądrowego oocytów oraz wzrostu liczby zarodków wykazujących potencjał rozwojowy porównywalny do potencjału rozwojowego zarodków uzyskanych klasyczną techniką zapłodnienia *in vitro*.

WYSOKA EFEKTYWNOŚĆ UZYSKIWANIA TRANSGENICZNYCH ZARODKÓW KLONALNYCH ŚWINI PO UŻYCIU PODDAWANYCH LIPOFEKCJI KOMÓREK-DAWCÓW JĄDER

HIGH EFFICIENT PRODUCTION OF PORCINE TRANSGENIC SOMATIC CELL CLONED EMBRYOS USING NUCLEAR DONOR CELL UNDERGOING LIPOFECTION

Skrzyszowska M.^{1,3}, Samiec M.¹, Lipiński D.², Słomski R.²

¹Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice/Kraków; ²Instytut Genetyki Człowieka, PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

³E-mail: mskrzysz@izoo.krakow.pl

Celem badań było określenie kompetencji rozwojowych *in vitro* transgenicznych zarodków świni rekonstruowanych techniką klonowania somatycznego. Źródłem komórek-biorców dla egzogennych jąder komórkowych były dojrzałe *in vitro* oocyty loszek lub loch. Z kolei, źródłem komórek-dawców jąder były fibroblasty tkanki skórnej ucha dorosłych osobników lub fibroblasty płodowe, transgenizowane *in vitro* przy zastosowaniu konstrukcji genowej *pWAPhGH-GFPBsd*. Konstrukcję genową wprowadzano do komórek fibroblastycznych przy zastosowaniu metody lipofekcji. Wskaźnikiem aktywności transkrypcyjnej i translacyjnej genu kodującego białko fuzyjne *pWAPhGH-GFPBsd* w transformowanych genetycznie komórkach była ekspresja reporterowego transgenu białka intensywnej zieleni fluorescencyjnej (eGFP). Stopień ekspresji tego genu oceniano przyżyciowo w oparciu o poziom biochemiluminescencji w hodowanych komórkach. Enukleowane oocyty rekonstruowano z jąder eGFP-pozytywnych komórek fibroblastycznych przy wykorzystaniu techniki fuzji indukowanej impulsami prądu stałego (elektrofuzji). Zrekonstruowane oocyty poddawano sztucznej aktywacji przy zastosowaniu jednoczesnej fuzji i aktywacji fizycznej (impulsy elektryczne). Zarodki klonalne hodowano *in vitro* przez 6-7 dni do osiągnięcia stadium moruli/blastocysty, a następnie oceniano w nich ekspresję reporterowego transgenu eGFP. Ogółem zrekonstruowano 271/310 (87,4%) wyjądrzonych oocytów z jąder transgenicznych fibroblastów płodowych oraz 294/348 (84,5%) - z jąder transgenicznych fibroblastów skóry dorosłych osobników. W warunkach hodowli *in vitro* uzyskano, 162/271 (59,7%) i 148/294 (50,3%) morul oraz 82/271 (30,2%) i 48/294 (16,3%) blastocyst, odpowiednio w grupie zarodków zrekonstruowanych z jąder fibroblastów płodowych oraz z jąder fibroblastów skóry dorosłych osobników. Podsumowując, transgenizacja komórek fibroblastycznych świni metodą lipofekcji skutkowała integracją całej konstrukcji genowej z DNA genomowym, która była pozytywnie skorelowana z ekspresją transgenu reporterowego na poziomie syntezy białka eGFP. Kompetencje jąder komórkowych fibroblastów płodowych do pokierowania rozwojem transgenicznych zarodków klonalnych świni były wyższe niż jąder fibroblastów tkanki skórnej dorosłych osobników. Z kolei, przyżyciowa analiza fluorescencyjna uzyskanych blastocyst wykazała blisko 100% indeks ekspresji transgenu eGFP w komórkach zarodkowych.

POSZUKIWANIE MARKERÓW MOLEKULARNYCH ZESPOŁU POLICYSTYCZNYCH JAJNIKÓW

SEARCHING FOR MOLECULAR MARKERS OF POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

Katarzyna Wertheim¹, Agnieszka Sobczynska-Tomaszewska¹, Jacek Maciejewski², Paweł Kubik²,
Urszula Szutkowska³, Artur Jacek Jakimiuk⁴, Radosław Rodzoch⁴, Jerzy Bal¹

¹Instytut Matki i Dziecka, Zakład Genetyki Medycznej, Warszawa, Ul. Kasprzaka 17a, 01-211,
katarzynawertheim@imid.med.pl

²Instytut Matki i Dziecka, Klinika Położnictwa i Ginekologii, Warszawa, Ul. Kasprzaka 17a, 01-211

³Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Genetyki i Biotechnologii,
Warszawa, ul. Pawińskiego 5a, 02-106

⁴Klinika Położnictwa i Ginekologii, Centralny Szpital Kliniczny, MSWiA, ul. Wołoska 137, , 02-507 Warszawa

Zespół policystycznych jajników (PCOS) rozpoznawany jest u około 10% kobiet w wieku rozrodczym przy wystąpieniu dwóch z poniższych objawów: *oligomenorrhea*, hiperandrogenizm, policystyczne jajniki w USG. Skutkiem choroby jest niepłodność oraz zwiększone ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2, chorób sercowo-naczyniowych i raka endometrium. Etiologia schorzenia pozostaje nieznana, postuluje się jednak udział czynników genetycznych i ich interakcję z czynnikami środowiskowymi. Przypuszcza się, iż z rozwojem choroby związane są polimorfizmy w genach metabolicznych.

Cel pracy:

Celem pracy była próba określenia korelacji pomiędzy wariantami genów: *IRS-1*, *IGF-2*, *SHBG*, *INS* a występowaniem objawów PCOS w Polskiej grupie pacjentek.

Materiały i metody:

Do badań włączono dotąd 64 pacjentki z rozpoznaniem PCOS i 37 zdrowych kobiet stanowiących grupę kontrolną. DNA izolowano z krwi obwodowej metodą wysalania. DNA analizowano z zastosowaniem sekwencjonowania oraz RFLP. Badano następujące warianty polimorficzne: G972R (*IRS-1*), *ApaI*-rs680A/G (*IGF-2*), TAAAn (*SHBG*) oraz VNTR klasy I/III (*INS*).

Wyniki:

-częstość wariantu G972R jest wyższa w grupie kobiet z PCOS
-częstość allele A wariantu *ApaI* jest niższa w grupie pacjentek niż w grupie kontrolnej, ale genotyp A/A jest częstszy w grupie pacjentek z PCOS.

-rozkład VNTR *INS* klasy I i III jest podobny w obu badanych grupach, natomiast homozygoty pod względem klasy III są częstsze w grupie pacjentek

-brak korelacji liczby powtórzeń sekwencji TAAAn z wystąpieniem PCOS

Wnioski

Uzyskane przez nas, wstępne, wyniki wskazują, że warianty genów *IRS-1*, *IGF-2*, *INS* mogą należeć do czynników związanych z patogenezą PCOS w grupie Polskich pacjentek. Dalsze badania na większej grupie pacjentów są prowadzone.

Finansowane z projektu badawczego KBN2P05E11729

IMMUNOLOKALIZACJA AROMATAZY (P450_{AROM}) W JAJNIKU DOJRZĄŁEJ MYSZY KOLCZYSTEJ (*ACOMYS CAHIRINUS*)

IMMUNOLOCALIZATION OF AROMATASE (P450_{AROM}) IN THE OVARY OF THE MATURE SPINY MOUSE (*ACOMYS CAHIRINUS*)

Monika Hułas-Stasiak, Agnieszka Szymczyk, Antoni Gawron

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
e-mail: monhul@o2.pl

Acomys cahirinus jako jedyny spośród rodziny myszowatych charakteryzuje się wydłużonym okresem rozwoju prenatalnego. Ciąża u tego gryzonia trwa blisko dwukrotnie dłużej niż u szczura czy myszy laboratoryjnej, a noworodki rodzą się w bardziej zaawansowanym stadium rozwoju. Aby stwierdzić czy taki sposób rozrodu może wpływać na mechanizm funkcjonowania jajnika badano lokalizację i ekspresję aromatazy. Białko to jest kluczowym enzymem zaangażowanym w proces steroidogenezy. Bierze udział w biosyntezie estrogenów, które pełnią bardzo ważną rolę w rozwoju jajnika i dojrzewaniu pęcherzyków jajnikowych.

Materiał doświadczalny stanowiły dojrzałe płciowo samice myszy kolczystej, trzymane w warunkach naturalnego fotoperiodu. Wyizolowane jajniki poddawano rutynowej procedurze histologicznej i na uzyskanych skrawkach parafinowych identyfikowano aromatazę (P450_{arom}) metodą immunohistochemiczną.

Stwierdzono, że aromataza obecna była przede wszystkim w cytoplazmie komórek ziarnistych pęcherzyków jajnikowych. Słaby odczyn reakcji obserwowano w pęcherzykach przedantralnych I i II-rzędowych. W pęcherzykach wczesnoantralnych i dużych antralnych, komórki ziarniste, a zwłaszcza te położone blisko jamki pęcherzyka odznaczały się silniejszą immunofluorescencją. Szczególnie intensywną reakcję odnotowano w cytoplazmie komórek granulozy pęcherzyków przedowulacyjnych oraz w komórkach gruczołu śródmiąższowego jajnika. Komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyków antralnych i dojrzałych wykazywały również pozytywną (choć nie tak silną jak w przypadku komórek ziarnistych) reakcję na obecność aromatazy. Komórki luteinowe ciała żółtego odznaczały się słabą immunoreaktywnością badanego białka. W oocytach wszystkich typów pęcherzyków jajnikowych nie stwierdzono pozytywnego odczynu na aromatazę.

Uzyskane wyniki wykazały, że ekspresja aromatazy w komórkach ziarnistych wzrasta wraz ze stopniem dojrzałości pęcherzyków jajnikowych. Silny odczyn reakcji w komórkach śródmiąższowych stromy jajnika może sugerować, że komórki te odgrywają istotną rolę w syntezie estrogenów.

ROZMIESZCZENIE RECEPTORÓW PROGESTERONU W JAJNIKU MYSZY KOLCZYTEJ (*ACOMYS CAHIRINUS*) PODCZAS ROZWOJU POSTNATALNEGO

DISTRIBUTION OF PROGESTERONE RECEPTOR IN THE SPINY MOUSE (*ACOMYS CAHIRINUS*) OVARY DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

Monika Hulaś-Stasiak, Antoni Gawron

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
e-mail: monhul@o2.pl

Acomys cahirinus popularnie nazywany myszą kolczystą jest wyjątkowym gatunkiem z rodziny *Muridae*. Ciąża u tego gryzonia trwa dwukrotnie dłużej niż u myszy czy szczura laboratoryjnego. Stąd noworodki myszy kolczystej odznaczają się bardziej zaawansowaną budową poszczególnych narządów wewnętrznych w tym również jajnika.

W żeńskich organizmach progesteron jest kluczowym hormonem regulującym procesy związane z rozrodem, utrzymaniem i rozwojem ciąży, a także procesem owulacji. Progesteron oddziałuje na komórkę za pośrednictwem specyficznych receptorów progesteronu (PR), które jako czynniki transkrypcyjne aktywują bądź inhibują transkrypcję odpowiedniego genu.

Celem przeprowadzonych badań było określenie lokalizacji i ekspresji receptorów progesteronu (PR) w jajniku nowonarodzonych, niedojrzałych i dojrzałych płciowo myszy kolczystych.

Materiał do badań stanowiły jajniki 1, 7, 14, 21, 30, 60, 90, 120 - dniowych samic *A. cahirinus*. Odczyny immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach parafinowych z użyciem specyficznych monoklonalnych przeciwciał anti-PR.

Wykazano obecność receptorów progesteronu we wszystkich badanych jajnikach włącznie z jajnikami noworodków. PR zlokalizowano w jądrach komórek nabłonka powierzchniowego oraz komórek stromy jajnika. W obrębie pęcherzyków jajnikowych receptory progesteronu zidentyfikowano przede wszystkim w komórkach ziarnistych oraz oocycie. W pęcherzykach II-rzędowych pozytywną reakcję stwierdzono również w komórkach osłonki wewnętrznej. Wykazano, istotne różnice w intensywności zabarwienia jąder komórek ziarnistych w poszczególnych typach pęcherzyków jajnikowych. W pęcherzykach I, II-rzędowych oraz wczesnoantralnych odczyn reakcji był słaby lub umiarkowany. Intensywne zabarwienie komórek granulozy i teki obserwowano w dużych pęcherzykach antralnych i przedowulacyjnych. Komórki luteinowe ciała żółtego wykazywały słaby immunoodczyn na obecność PR.

Receptory progesteronu zlokalizowano przede wszystkim w jądrach komórek ziarnistych wszystkich typów pęcherzyków jajnikowych od pierwotnych po przedowulacyjne. Stwierdzono, że intensywność odczynu reakcji zależała głównie od typu pęcherzyka jajnikowego a nie od wieku badanych zwierząt i rosła wraz ze stopniem rozwoju pęcherzyka jajnikowego.

OSZACOWANIE POZIOMU MRNA P450SCC I 3 β -HSD W KOMÓRKACH PĘCHERZYKOWYCH JAJNIKÓW LOSZEK W MONO- I KOKULTURZE PO KRÓTKOTERMINOWEJ EKSPOZYCJI NA ZEARALENON

ASSESSMENT OF P450SCC AND 3 β -HSD MRNA LEVEL IN THE FOLLICULAR CELLS OF PREPUBERTAL GILTS OVARIES IN MONO- AND COCULTURE AFTER SHORT-TERM EXPOSURE TO ZEARALENONE

Ewa Jakimiuk¹, Paweł Brzuzan², Magdalena Gajęcka¹, Maciej Woźny², Łukasz Zielonka¹
Maciej Gajęcki¹

¹*Zespół Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn, ewa.jakimiuk@uwm.edu.pl*

²*Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Słoneczna 45g, 10-709 Olsztyn*

Przeprowadzone badania miały na celu oznaczenie względnej ilości produktu RT-PCR (RQ) genów CYP_{scc} i 3 β -HSD w komórkach pęcherzykowych jajników loszek, w hodowli *in vitro*, po ekspozycji na zearalenon (ZEA).

Poziom ekspresji mRNA P450_{scc} i 3 β -HSD w jednowarstwowej hodowli komórek pęcherzykowych jajnika oznaczono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR). Komórki pęcherzykowe pozyskiwano, od niedojrzałych płciowo loszek, z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 3-6 mm. Komórki ziarniste w monokulturze (8×10^5 /ml) oraz komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej w kokulturze (8×10^5 : 2×10^5 /ml), poddano ekspozycji, w medium *serum-free*, na: DMSO (0,5%) - hodowle kontrolne oraz ZEA (400 ng/ml) - hodowle doświadczalne przez 15, 30 i 60 min. Oszacowanie względnej ilości produktu RT-PCR (RQ) genów CYP_{scc} i 3 β -HSD wobec próby endogennej (β -aktyna) przeprowadzono przy użyciu porównawczej metody Ct (metoda „delta-delta”). Istotność różnic w wartościach RQ testowano z użyciem analizy wariancji ANOVA oraz testu *posteriori* Tukey’a.

Traktowanie ZEA komórek pęcherzykowych jajnika w kokulturze zwiększało ($P < 0,05$) poziom mRNA P450_{scc} oraz 3 β -HSD po 30 min. i 60 min. ekspozycji na mikotoksynę w porównaniu do liczby transkryptów P450_{scc} oraz 3 β -HSD w kokulturze po 15 min. ekspozycji. Liczba transkryptów P450_{scc} oraz 3 β -HSD w kokulturze po 30 min. inkubacji z ZEA, była istotnie ($P < 0,05$) wyższa od poziomu mRNA P450_{scc} i 3 β -HSD w monokulturze po 15 min. ekspozycji na ZEA. W hodowli komórek ziarnistych w monokulturze stwierdzano niższe niż w hodowli komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej w kokulturze poziomy mRNA zarówno dla P450_{scc} jak i 3 β -HSD. Traktowanie ZEA powodowało zauważalne, lecz nie istotne statystycznie, zmniejszenie liczby transkryptów P-450_{scc} oraz 3 β -HSD w monokulturze ($RQ < 1,00$) we wszystkich przedziałach czasowych doświadczenia. W przypadku 3 β -HSD po 30 min. ekspozycji na czynnik badany stwierdzono zwiększenie poziomu mRNA 3 β -HSD do wartości kontrolnych.

Na podstawie otrzymanych rezultatów stwierdzono, iż w komórkach pęcherzykowych jajników loszek ZEA wpływa na poziom mRNA P450_{scc} i 3 β -HSD, w sposób zależny od typu hodowli i czasu trwania ekspozycji. Zmiany w liczbie transkryptów mRNA badanych genów obserwowane w ramach czasowych doświadczenia wskazują na oddziaływanie ZEA na proces stabilizacji i/lub degradacji mRNA.

EKSPRESJA GENÓW WNT I β -KATENINY W CIAŁKU ŻÓŁTYM CIĘŻARNYCH ŚWIŃ

EXPRESSION OF WNT AND β -CATENIN GENES IN CORPUS LUTEUM OF PREGNANT PIGS

Jolanta Kiewisz*, Monika Kaczmarek, Agnieszka Blitek, Gabriel Bodek, Adam J. Ziecik

*Zakład Mechanizmów Działania Hormonów, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w
Olsztynie, 10-747 Olsztyn, E-mail: kiewisz@pan.olsztyn.pl*

Kanoniczny szlak transdukcji sygnału komórkowego, prowadzący do cytoplazmatycznej kumulacji β -kateniny jest aktywowany przez geny Wnt 1, 3, 3a, 7a, natomiast geny Wnt 2, 4, 5a, 5b, 6, 7b, 11 aktywują szlaki stanowiące drogę niekanoniczną. Wiadomo, że geny Wnt ulegają ekspresji w błonie śluzowej macicy w okresie okołoinplantacyjnym, natomiast brak jest informacji dotyczącej ich ekspresji w ciałku żółtym (CL) podczas procesu zagnieżdżania zarodka. Dlatego celem pracy było zbadanie ekspresji genów Wnt 5a i Wnt 7a, a także β -kateniny w CL świń w różnych dniach ciąży. Do badań wykorzystane zostały loszki po przebyciu dwóch regularnych cykli rujowych. Po 12 godzinach od wykrycia objawów trzeciej rui, 15 świń poddanych zostało dwukrotnej sztucznej inseminacji, a następnie w 9 (n=5), 12 (n=5) i 15-16 (n=5) dniu ciąży pobrane zostały CL. Zmiana ekspresji genów Wnt została określona po wykonaniu analizy Real-time PCR. W badanej tkance zaobserwowano istotny spadek ekspresji genu Wnt 5a ($P < 0.01$) oraz obniżenie ekspresji genu β -kateniny ($P < 0.05$) w 12 dniu ciąży w stosunku do dnia 9. Ponadto, ekspresja genu Wnt 5a pozostawała na niskim poziomie również w 15-16 dniu ciąży ($P < 0.01$). Utrzymująca się na stałym, ale niskim poziomie ekspresja genu Wnt 7a ($P > 0.05$) i zmiana ekspresji genu β -kateniny świadczy o możliwym aktywowaniu szlaku kanonicznego przez inne, niż Wnt 7a, białka z tej rodziny. Uzyskane wstępnie wyniki sugerują ekspresję czynników aktywujących zarówno kanoniczny, jak i niekanoniczny szlak transdukcji sygnału komórkowego w CL świni. Jakkolwiek, sposób działania i rola tych białek podczas wczesnej ciąży w CL wymaga dalszych badań.

JK otrzymuje stypendium doktoranckie Prezesa Polskiej Akademii Nauk (PAS; #4/S/2007)

DYSTRYBUCJA ORAZ CHARAKTERYSTYKA NUROCHEMICZNA NEURONÓW ZWOJU KREZKOWEGO TYLNEGO (IMG) ZAOPATRUJĄCYCH JAJNIKI ŚWINI

DISTRIBUTION AND NEUROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF INFERIOR MESENTERIC GANGLION (IMG) NEURONS SUPPLYING THE PORCINE OVARIES

Marlena Koszykowska^{1*}, Anna Kozłowska¹, Joanna Wojtkiewicz², Cezary Skobowiat², Mariusz Majewski², Barbara Jana¹

¹ Zakład Patologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn, * koszykowska@pan.olsztyn.pl

² Zespół Fizjologii Klinicznej, Katedra Morfologii Funkcjonalnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

Cel pracy: O ile sposób zaopatrzenia i charakterystyka neurochemiczna neuronów IMG zaopatrujących jajniki loszek niedojrzałych płciowo zostały do chwili obecnej dobrze poznane, o tyle brak jest zupełnie danych dotyczących rozmieszczenia i chemizmu neuronów IMG unerwiających jajniki świń dojrzałych płciowo. Dlatego celem niniejszych badań było określenie dystrybucji oraz kodowania chemicznego tj. obecności β -hydroksylazy dopaminy ($D\beta H$), neuropeptydu Y (NPY), somatostatyny (SOM) oraz galaniny (GAL) w wyznakowanych wstecznie komórkach IMG zaopatrujących jajniki loszek dojrzałych płciowo.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na seryjnych skrawkach mrozeniowych (grubość 10 μm) zwojów kreskowych tylnych pobranych od loszek ($n=3$) w 20 dniu cyklu rujowego. Na sześć tygodni przed pobraniem materiału badawczego, jajniki tych zwierząt nastrzykiwano znacznikiem neuronalnym Fast Blue (FB), w celu wstecznego wyznakowania neuronów zaopatrujących gonady. Do badań użyto rutynowej techniki podwójnych barwień immunofloroscencyjnych wykorzystujących różnogatunkowe przeciwciała pierwotne ($D\beta H$, NPY, SOM, GAL). Kompleks antygen-przeciwciało uwidaczniano za pomocą odpowiednich przeciwciał wtórnych znakowanych FITC oraz CY3.

Wyniki: Neurony FB^+ zaopatrujące jajniki obserwowano zarówno w prawym (66%), jak i lewym (34%) zwoju IMG. Były to przede wszystkim komórki o małej średnicy (74%), oraz neurony duże (25%). Większość komórek (98%) FB^+ niezależnie od ich wielkości, zawierało $D\beta H$ i/lub NPY, $D\beta H$ i/lub SOM oraz $D\beta H$ i/lub GAL. Natomiast, 1% wstecznie wyznakowanych neuronów nie wykazywało obecności żadnej z badanych substancji. Stwierdzono, że ok. 50% całej populacji noradrenergicznych komórek FB^+ była jednocześnie NPY-IR, podczas gdy komórki zawierające $D\beta H/SOM$ i $D\beta H/GAL$ stanowiły 21% oraz 19%, odpowiednio. Z kolei, ok. 70% wszystkich badanych neuronów było $D\beta H$ -IR, a NPY-, SOM- i/lub GAL-immunonegatywnych. Co więcej, wykazano, także występowanie populacji nielicznych (ok. 2%) nienoradrenergicznych komórek FB -IR, zawierających NPY, SOM lub GAL. Neurony kodujące $D\beta H$, $D\beta H/NPY$, $D\beta H/SOM$ oraz $D\beta H/GAL$, jak również nienoradrenergiczne komórki NPY-, SOM-, GAL-IR lokalizowano przede wszystkim w centralnym obszarze zwoju. Ponadto, wykazano, że perikariony FB^+ , niezależnie od centralnej lub obwodowej lokalizacji były zaopatrywane przez pojedyncze lub nieliczne (2-5) włókna nerwowe $D\beta H$ -, NPY-, SOM- lub GAL-IR.

Wnioski: Uzyskane wyniki badań po raz pierwszy pokazują dystrybucję i kodowanie chemiczne neuronów zwoju kreskowego tylnego unerwiającego jajnik loszek dojrzałych płciowo. Występowanie licznej populacji neuronów noradrenergicznych IMG może sugerować na ich ważną fizjologiczną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu gonad świń.

LOKALIZACJA P450_{SCC}, 3 β -HSD I P450_{AROM} W TORBIELOWATO ZMIENIONYCH JAJNIKACH ŚWINI

THE LOCALIZATION OF P450_{SCC}, 3 β -HSD AND P450_{AROM} IN THE CYSTIC-CHANGED PORCINE OVARIES

Anna Kozłowska, Barbara Jana

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn,
andzik@pan.olsztyn.pl*

Cel pracy. Zwyródnienie torbielowate jajników (ZTJ), będące następstwem upośledzenia owulacji, jest częstym i poważnym schorzeniem u samic zwierząt gospodarskich, głównie krów, powodującym czasową lub trwałą niepłodność. Pomimo wieloletnich badań, etiopatogeneza tego schorzenia nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Obecnie przyjmuje się, że torbiele powstają najczęściej w wyniku zakłóceń współzależności sekrecyjnych między podwzgórzem, przysadką, a jajnikiem. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że jedną z przyczyn ZTJ u krów i świń mogą być zaburzenia sekrecji hormonów steroidowych powstające m.in. w wyniku zmian aktywności enzymu rozszczepiającego łańcuch boczny cholesterolu (P450_{SCC}), dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (3 β -HSD) oraz aromatazy (P450_{AROM}). Do tej pory nie badano zmian w lokalizacji enzymów uczestniczących w syntezie hormonów steroidowych w torbielowatych jajnikach świni, dlatego celem niniejszego doświadczenia było określenie lokalizacji P450_{SCC}, 3 β -HSD i P450_{AROM} w gonadach loszek po indukcji *status polycysticus*.

Materiał i metody. Torbiele jajnikowe u loszek (grupa DXM, n=6) były indukowane poprzez domięśniowe podawanie fosforanu sodowego deksametasonu (DXM) w ilości 3,3 μ m/kg masy ciała od 7 do 21 dnia pierwszego badanego cyklu rujowego. W tym samym czasie zwierzętom z grupy kontrolnej (K, n=6) podawano płyn fizjologiczny. W 11 dniu drugiego badanego cyklu rujowego pobrano jajniki i przeprowadzono ich ocenę makroskopową. W celu określenia lokalizacji P450_{SCC}, 3 β -HSD i P450_{AROM} kriostatowe skrawki gonad barwiono metodą pojedynczej immunofluorescencji.

Wyniki. W jajnikach loszek otrzymujących DXM stwierdzono obecność torbieli o średnicy 1-2 cm, w ilości 7.0 $\pm$ 1.2 na jajnik, obniżenie (P<0.05) liczby pęcherzyków o średnicy 1-3 mm oraz brak pęcherzyków o średnicy 4-6 mm i ciałek żółtych. Mikroskopowe obserwacje torbielowato zmienionych jajników wykazały słabszą immunoreaktywność (IR) P450_{SCC} w komórkach pęcherzykowych (KP) pęcherzyków primordialnych w porównaniu do loszek kontrolnych. W grupie DXM, dodatnią IR P450_{SCC} stwierdzono w komórkach ziarnistych (KZ) pęcherzyków drugorzędowych, podczas gdy nie obserwowano jej w grupie K. KZ pęcherzyków trzeciorzędowych o średnicy do 3 mm zwierząt otrzymujących DXM były P450_{SCC}-negatywne. Komórki te w grupie K wykazywały słabą IR P450_{SCC}. U loszek, którym podawano DXM reakcja barwna P450_{SCC}, była intensywniejsza w komórkach osłonki wewnętrznej (KOW) pęcherzyków trzeciorzędowych o średnicy do 3 mm niż u zwierząt kontrolnych. W KZ i KOW torbieli IR P450_{SCC} była wyższa w porównaniu z pęcherzykami o średnicy 4-6 mm w grupie K. W grupie DXM słabą reakcję w kierunku 3 β -HSD wykazano w KP pęcherzyków primordialnych, KZ pęcherzyków pierwos- i drugorzędowych. W grupie K komórki te były immunonegatywne. Brak IR 3 β -HSD stwierdzono także w KZ pęcherzyków trzeciorzędowych o średnicy 4-6 mm, podczas gdy KZ w torbielach wykazywały słabą reakcję. Immunoekspresja P450_{AROM} była silniejsza w KZ pęcherzyków trzeciorzędowych o średnicy do 3 mm w grupie DXM niż w grupie K. W KZ i KOW torbieli IR P450_{AROM} była intensywniejsza w porównaniu do tej, obserwowanej w pęcherzykach trzeciorzędowych o średnicy 4-6 mm w grupie K.

Wniosek. Uzyskane wyniki pokazują, że w torbielowatych jajnikach świni zmieniona jest lokalizacja P450_{SCC}, 3 β -HSD i P450_{AROM}.

ANTYAPOPTOTYCZNY WPŁYW DZIAŁANIA GRELINY W PĘCHERZYKU JAJNIKOWYM ŚWINI

ANTI-APOPTOTIC EFFECT OF GHRELIN IN PIG OVARIAN FOLLICLES

Agnieszka Rak, Ewa Gregoraszczyk

*Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków,
e-mail: agnieszka.rak@uj.edu.pl*

Wstęp: Proces atrezji pęcherzyka jest jednym z procesów kontrolujących prawidłowy wzrost i funkcję pęcherzyka jajnikowego. Jest to hormonalnie kontrolowany, molekularny proces apoptozy. Na każdym ze stadiów rozwoju pęcherzyka mogą one ulec atrezji. Z ogromnej puli pęcherzyków jajnikowych niewiele, ok. 1% owuluje. Pozostałe ulegają atrezji, czyli fizjologicznej degradacji i eliminacji na różnych etapach folikulogenezy.

Grelina jest 28 aminokwasowym peptydem, wyizolowanym z żołądka szczura, którego działanie polega przede wszystkim na stymulacji wydzielania hormonu wzrostu oraz zwiększaniu łaknienia i indukowaniu otyłości. Ostatnie badania wskazują na znaczącą rolę tego hormonu w regulacji funkcji rozrodczych. Grelina jest hormonem wydzielanym przez pęcherzyk jajnikowy i regulującym procesy steroidogenezy i proliferacji komórek jajnika.

W zależności od rodzaju tkanki grelina w różny sposób reguluje proces apoptozy. Antyapoptotyczne działanie greliny wykazano m.in. w kardiomiocytach, adipocytach i komórkach endotelialnych. Proapoptotyczne działanie greliny wykazano w komórkach nowotworowych nadnerczy (*aldosteroma* i *adrenocarcinoma*).

Cel pracy: Celem pracy było zbadanie wpływu greliny na procesy apoptozy zachodzące w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni.

Materiał i Metody: Hodowle prowadzono w postaci kokultur komórek warstwy ziarnistej oraz osłonki wewnętrznej pęcherzyka. Po 24 godzinach inkubacji, pożywkę zmieniano na świeżą (M199), dodawano grelinę w wzrastających dawkach: 100, 250, 500 i 1000 pg/ml i hodowano przez 48 godzin. Proces apoptozy badano trzema niezależnymi metodami:

1. Badanie aktywności kaspazy-3: Po zakończeniu hodowli usunięto medium, a w komórkach oznaczano aktywność enzymatyczną kaspazy-3 metoda kolorymetryczną, używając specyficznego substratu Ac DEVD-pNA-(7-amino-4-methyl coumarin), Sigma.

2. Określenie fragmentacji DNA używając komercyjnie dostępnych zestawów *Cellular DNA Fragmentation ELISA* firmy Roche, USA. Zestaw ten pozwala oznaczyć ilość uwalnianej do cytoplazmy wbudowanej we fragmenty DNA bromodeoksyurydyny (BrdU) przez komórki apoptotyczne towarzyszące degradacji DNA.

3. Określenie ilości komórek apoptotycznych. Detekcję apoptozy na poziomie pojedynczych komórek mierzono poprzez kolorymetryczny pomiar fragmentacji DNA jądrowego w komórkach wykorzystując peroksydazę chrzanową i jej substrat DAB (3,3-diaminobenzzydinę) wybarwiając jądra komórek apoptotycznych. Do badań wykorzystano zestaw *TUNEL Apo-BrdU-IHCTM DNA Fragmentation Assay Kit* (BioCAT, USA).

Wyniki: Grelina we wszystkich stosowanych dawkach obniża aktywność enzymatyczną kaspazy-3 i ilość pofragmentowanych odcinków DNA. Analiza TUNEL potwierdziła te badania, wykazując mniejszą ilość komórek apoptotycznych po podaniu greliny.

Wnioski: Przedstawione wyniki wskazują na antyapoptotyczne działanie greliny w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni.

Praca wykonana w ramach projektu: 2748/B/PO1/2007/33.

EKSPRESJA GENU RECEPTORA OREKSYNY TYPU 1 W JAJNIKU ŚWIŃ W CZASIE CYKLU RUJOWEGO

OREXIN TYPE 1 RECEPTOR GENE EXPRESSION IN THE PORCINE OVARY DURING THE OESTROUS CYCLE

Nina Smolińska^{1,2}, Anna Nitkiewicz¹, Jadwiga Przła¹, Tadeusz Kamiński¹

¹Katedra Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 1A, 10-957 Olsztyn; ²E-mail: nina.smolinska@uwm.edu.pl

Oreksyny A i B są hormonami posiadającymi wspólny prekursor - prepro-oreksynę, złożoną u człowieka i świni ze 130 aminokwasów. Poznano dotychczas dwa receptory oreksyn: typu 1 (OX1R) i typu 2 (OX2R). Główną funkcją oreksyn jest udział w kontroli pobierania pokarmu i homeostazy energetycznej, a także w regulacji snu i czuwania. Ostatnie badania sugerują znaczącą rolę oreksyn w regulacji funkcji rozrodczych. Ekspresję genów receptorów oreksyn wykazano m.in. w różnych strukturach podwzgórza, przednim i tylnym płacie przysadki, nerkach, nadnerczach, jajrach i jajnikach, ale tylko u człowieka i szczura. Celem prezentowanej pracy było zlokalizowanie i porównanie ekspresji genu OX1R w ciałku żółtym świń w 2-3, 10-12 i 14-16 dniu cyklu, oraz w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świń w 17-19 dniu cyklu.

Ekspresję genu OX1R wykazano za pomocą ilościowej analizy mRNA metodą real-time PCR. Mieszanina reakcyjna, obok specyficznych oligonukleotydowych starterów, zawierała barwnik SYBR Green, mieszaninę dNTP, polimerazę DNA AmpliTaq Gold i jony Mg²⁺. Real-time PCR przeprowadzono w 50 µl mieszaniny reakcyjnej w następujących warunkach: aktywacja polimerazy DNA w 95°C przez 10 minut, następnie dwa etapy pomnożone przez 40 cykli: 1) denaturacja w celu rozplecenia podwójnych nici DNA w 95°C przez 15 sekund, 2) przyłączenie starterów do matrycy w 59°C przez 1 minutę. W celu potwierdzenia specyficzności amplifikowanych produktów, dla każdej próby przygotowano krzywą dysocjacji. Ponadto przeprowadzono sekwencjonowanie produktu real-time PCR. Dla genów badanego i referencyjnego (GAPDH) wykonano krzywe standardowe. Wszystkie próby amplifikowano w duplikatach, a GAPDH wykorzystano jako standard, według którego ilościowo oszacowano ekspresję genu OX1R. Negatywną kontrolę real-time PCR przeprowadzono z użyciem prób z wodą zamiast cDNA. Pozytywną kontrolę ekspresji genu OX1R stanowiła ekspresja w bocznej części podwzgórza.

Stwierdzono ekspresję genu OX1R w ciałku żółtym świń w 2-3, 10-12 i 14-16 dniu cyklu oraz w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świń w 17-19 dniu cyklu. Ekspresja mRNA OX1R w ciałku żółtym w 2-3 i 10-12 dniu cyklu była istotnie wyższa ($p < 0,05$ - $p < 0,001$) w porównaniu z 14-16 dniem cyklu i z ekspresją w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej w 17-19 dniu cyklu. Podobnie istotnie wyższą ($p < 0,01$ - $p < 0,001$) ekspresję genu OX1R stwierdzono w ciałku żółtym w 14-16 dniu cyklu rujowego w stosunku do ekspresji w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej. Natomiast w 2-3 i 10-12 dniu cyklu ekspresja receptora w ciałku żółtym była na zbliżonym poziomie. Różnic istotnych statystycznie nie stwierdzono również w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego. Homologia produktu real-time PCR OX1R (uzyskanego w naszych badaniach) w stosunku do sekwencji genu OX1R zdeponowanej w Banku Genów wyniosła 99%.

Wykazanie zróżnicowanej ekspresji genu OX1R w ciałku żółtym oraz w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świń podczas cyklu rujowego sugeruje, że oreksyny poprzez swój receptor mogą odgrywać istotną rolę w kontrolowaniu funkcjonowania układu rozrodczego stanowiąc łącznik między homeostazą energetyczną a rozrodem, może wskazywać też na możliwość bezpośredniego wpływu oreksyn na funkcję jajnika.

Praca wykonana w ramach Projektu Badawczego MNiSW Nr N N308 122134 (2008-2011 r.).

CZY CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORU- α MODULUJE WRAŻLIWOŚĆ CIAŁKA ŻÓŁTEGO KROWY NA CZYNNIKI LUTEOTROPOWE?

IS TUMOR NECROSIS FACTOR- α AN MODULATOR OF SENSITIVITY OF BOVINE CORPUS LUTEUM ON LUTEOTROPIC FACTORS?

Anna Z. Szóstek, Karolina Łukasik, Mamadou M. Bah, Dariusz J. Skarżyński,

¹ Zakład Immunologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn
skadar@pan.olsztyn.pl

Czynnik martwicy nowotworu- α (TNF α) w układzie rodnym może wykazywać zarówno działanie luteotropowe przez stymulację proliferacji komórek śródbłonna naczyń CL, regulację produkcji luteotropowej prostaglandyny E₂ (PGE₂) i pośrednio progesteronu (P4) we wczesnej fazie lutealnej, jak i luteolityczne - uczestnicząc z innymi cytokinami w regulacji funkcjonalnej i strukturalnej luteolizy. Celem pracy było określenie, czy TNF α wpływa na wrażliwość CL na czynniki luteotropowe (hormon luteinizujący - LH, PGE₂) oraz czy może regulować pulsacyjne uwalnianie P4 z CL krowy *in vitro*. W badaniach określony został: (1) pośredni wpływ TNF α na wydzielanie P4 w CL - poprzez czynniki regulacyjne uwalniane z macicy (prostaglandyny); (2) pośredni wpływ TNF α na wrażliwość CL na czynniki luteotropowe (LH, PGE₂), poprzez czynniki regulacyjne uwalniane z macicy; (3) bezpośredni wpływ TNF α na pulsacyjne wydzielanie P4 z CL *in vitro*; 4) bezpośredni wpływ TNF α na wrażliwość CL na czynniki luteotropowe (LH, PGE₂).

W **Doświadczeniu 1.** na 4 godz. przed przyżyciowym pobraniem CL (8-9 dzień cyklu), zwierzętom podawano we wlewie domacicznym TNF α w dawkach: 0.01 μ g (dawka luteolityczna) i 1 μ g w 5 ml płynu fizjologicznego (dawka luteotropowa). CL pozyskano poprzez kolpotomię. Jedną część CL użyto do hodowli i pocięto na skrawki (około 50 mg), które preinkubowano w medium hodowlanym DME/F12 i stymulowano LH (100 ng/ml) oraz PGE₂ (10⁻⁶M) przez 24h. W medium zmierzono stężenie P4, PGF_{2 α} i PGE₂ metodą EIA. Drugą część CL zabezpieczono w RNA-later i zamrażano do czasu wykonania dalszych analiz; ekspresji genów dla syntazy PGF_{2 α} (AKR1B5), syntazy PGE₂ (PGES) oraz genu referencyjnego GAPDH metodą Real Time RT-PCR. Wykazano, że TNF α , w obu dawkach zwiększył wydzielanie P4 oraz PGE₂, przy czym w dawce 0.01 μ g zwiększył (P<0.05), a w dawce 1 μ g zmniejszał dodatkowo poziom PGF_{2 α} (P<0.05). Po podaniu TNF α w dawce 0.01 μ g obniżyło się LH-stymulowane wydzielanie P4. Natomiast w dawce 1 μ g wzrosło wydzielanie P4, a za to obniżyło się stężenie PGF_{2 α} i PGE₂. Pod wpływem TNF α podanego do macicy w dawce 0.01 μ g wzrosła ekspresja genu AKR1B5 (P<0.05) w CL, a ekspresja PGES nie zmieniła się (P>0.05). Natomiast pod wpływem TNF α podanego w dawce 1 μ g obniżyła się ekspresja AKR1B5 (P<0.05), a ekspresja PGES pozostała na tym samym poziomie (P>0.05). W **Doświadczeniu 2.** CL krowy (8-9 dzień) perfundowano w systemie mikrodializy *in vitro* płynem fizjologicznym (grupa kontrolna) lub TNF α (1 μ g/ml), a następnie LH (1 μ g/ml) lub PGE₂ (2 x 10⁻² M). Dawki wybrano w doświadczeniu wstępnym - dawkę TNF α należy uznać za niską-luteolityczną, uwzględniając 1-2% wydajność kaniuli mikrodializacyjnej. W perfuzatach mierzono stężenie P4, PGF_{2 α} i PGE₂ metodą EIA. Stężenie PGF_{2 α} było poniżej czułości metody. Wykazano, że TNF α hamował stymulujący wpływ LH i PGE₂ na uwalnianie P4 (P<0.05), przy jednoczesnym braku wpływu na pulsacyjne i podstawowe uwalnianie P4 (P>0.05).

Działanie TNF α na CL (pośrednie i bezpośrednie) jest zależne od dawki. Dawka niska, podana zarówno do CL, jak i do macicy, wzmacnia procesy luteolityczne i zmniejsza wrażliwość CL na czynniki luteotropowe. Wysokie dawki tej cytokiny podane *in vivo* stymulują szlak przemian metabolicznych związanych z procesami luteotropowymi, wzmagając syntezę i uwalnianie PGE₂ i P4 w CL krowy.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSW nr 2P06K 025 29.

PIERWOTNE KOMÓRKI PŁCIOWE I MOŻLIWOŚĆ NEO-OOGENEZY W JAJNIKACH DOROSŁYCH MYSZY

GERMLINE STEM CELLS AND POSSIBILITY OF NEO-OOGENESIS IN OVARY IN THE ADULT MICE

Leopold Śliwa

*Zakład Biologii Rozwoju Człowieka, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński,
ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków e-mail:leosliwa@cm-uj.krakow.pl*

Powszechnie akceptowanym w embriologii jest stwierdzenie, że początkowe etapy oogenezy, takie jak powstawanie i namnażanie pierwotnych komórek płciowych, różnicowanie się oocytów pierwszego rzędu zachodzi u ssaków jedynie w okresie prenatalnym. Po urodzeniu w jajnikach występuje zdeterminowana ilość pęcherzyków pierwotnych w których zatrzymane w profazie I mejozy oocyty stanowią definitywną pulę komórek odpowiedzialnych za płodność samicy. Pierwotne komórki płciowe oraz możliwość stałego powstawania nowych pokoleń oocytów ma miejsce naturalnie jedynie w jajnikach niektórych ssaków np. wybranych gatunków małpiek. Znane są, coraz liczniejsze, doniesienia wskazujące na stałą obecność pierwotnych komórek płciowych oraz możliwość zachodzenia w okresie postnatalnym początkowych etapów oogenezy (neo-oogenezy) w jajnikach myszy i człowieka. (Johnson i wsp. 2004; Bukovsky i wsp. 2004) Celem pracy jest znalezienie dodatkowych danych weryfikujących hipotezę możliwości zachodzenia neo-oogenezy w jajnikach dorosłych myszy.

Materiałem do badań były jajniki 3 do 5 miesięcznych myszy szczepu BALBc z hodowli Zakładu Biologii Człowieka, obrabiane standardową metodą histologiczną, barwione hematoksyliną i eozyną, barwnikiem Giemzy oraz histochemicznie na aktywność fosfatazy zasadowej.

W trakcie mikroskopowej analizy jajników dorosłych myszy stwierdzono w nabłonku pokrywającym gonadę obecność komórek mających cechy pierwotnych komórek płciowych. Są one większe od nabłonkowych, mają nieregularne kształty oraz wykazują aktywność fosfatazy zasadowej. Komórki te dzielą się również mitotycznie i mają skłonność do opuszczania nabłonka. Wydaje się, że w tym przypadku mogą jeszcze znacznie powiększać wymiary co sugeruje ich przemianę w oocyt. W najbardziej zewnętrznej warstwie kory jajnika, w bezpośrednim kontakcie z nabłonkiem okrywającym spotykane są duże komórki przechodzące podziały mitotyczne po których pozostają w ścisłym kontakcie. Komórki te mają ameboidalne kształty, wykazują słabą aktywność fosfatazy kwaśnej i zostały sklasyfikowane jako namnażające się oocyt. Stwierdzono również ich dalsze przemieszczanie się w bardziej wewnętrzne warstwy kory jajnika gdzie po dalszym powiększeniu wymiarów rozpoczynają profazę podziału meiotycznego a wokół niektórych gromadzą się komórki ziarniste formując jajnikowe pęcherzyki pierwotne. Opisane procesy nie są częste, gdyż w jajniku można odszukać jedynie pojedyncze komórki znajdujące się w opisanych stadiach rozwoju.

Dokonane obserwacje wskazują na możliwość, choć ograniczoną, funkcjonowania lub powstawania w jajnikach dorosłych myszy komórek prapłciowych oraz ich namnażania i przekształcania się w oocyt. Oocyt może regenerować pierwotne pęcherzyki jajnikowe. Nie jest jasna jednak geneza i znaczenie tego procesu gdyż ze względu na jego unikalność nie może on mieć istotnego znaczenia dla płodności samicy.

Obecnie trwają badania nad aktywnością genetyczną tych komórek, mające na celu potwierdzenie wstępnych, histologicznych, obserwacji możliwości ich zaangażowania w neo-oogenezę.

Johnson J., Canning J., Kaneko T., Pru J.K., Tilly J.L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145-150.

Bukovsky A., Caudle M.R., Svetlikova M., Upadhyaya N.B. 2004. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 20-35.

JAKOŚĆ OOCYTÓW A DOJRZAŁOŚĆ PŁCIOWA LOSZEK

QUALITY OF OOCYTES IN RELATION TO PUBERTY OF GILTS

Ewelina Warzych-Plejer, Emilia Pers-Kamczyc, Natalia Reńska, Magdalena Giertych, Kamila Braun,
Dorota Lechniak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań,
lechniak@jay.au.poznan.pl

Optimalizacja procedury pozyskiwania zarodków świni w warunkach laboratoryjnych ma kluczowe znaczenie dla rozwoju bardziej zaawansowanych biotechnik jak klonowanie czy transgeneza. Ze względu na anatomiczne i fizjologiczne podobieństwa do człowieka, świnia odgrywa szczególną rolę jako gatunek modelowy. Podstawowym źródłem oocytów w procedurze zapłodnienia *in vitro* są jajniki loszek rzeźnych. W chwili osiągnięcia masy ubojowej około 100kg, wiele loszek nadal nie jest dojrzała płciowo. Ponieważ oocyty samic niedojrzałych płciowo charakteryzują się obniżonym potencjałem rozwojowym, zjawisko to może ograniczać efektywność procedury dojrzewania i zapłodnienia oocytów świni *in vitro*.

Celem niniejszej pracy jest ocena jakości oocytów pozyskanych od niedojrzałych (LND) i dojrzałych (LD) płciowo loszek rzeźnych.

Material i metody: kompleksy oocyt-kumulus (KOK) pozyskiwano z jajników loszek rzeźnych. Dojrzałość płciową oceniano na podstawie morfologii jajników, głównie obecności ciałek żółtych (Bagg i wsp Theriogenology 62 2004). KOK o prawidłowej morfologii poddawano testowi BCB w celu identyfikacji oocytów o wysokiej kompetencji rozwojowej (El Shourbagy i wsp Reproduction 131 2006). Obie kategorie KOK (BCB+, BCB-) poddano dojrzewaniu *in vitro*, po czym usunięto otaczające komórki pęcherzykowe i zmierzono wewnętrzną średnicę osłonki przejrzystej [klasy wielkościowe: 1) $<120,0\mu\text{m}$; 2) $\geq 120,0\mu\text{m}$; Hirao i wsp JReprodFertil 100 1994]. Oocyty z poszczególnych klas analizowano w kierunku apoptozy metodą Tunel.

Wyniki: badaniami objęto 967 KOK o prawidłowej morfologii (LND 567, LD 398). Zdecydowana większość KOK (83.7%) posiadała wysoką kompetencję rozwojową (BCB+), przy czym udział oocytów niekompetentnych (BCB-) był 2x wyższy u loszek niedojrzałych (21.8%) niż dojrzałych (10.3%). Większość analizowanych KOK (84.2%) posiadało średnicę powyżej $120\mu\text{m}$. Po uwzględnieniu kategorii samic okazało się, że więcej oocytów loszek LND miało średnicę $<120\mu\text{m}$ (41.5%) w porównaniu z loszkami LD (31.0%). Komórki apoptotyczne (Tunel+) stanowiły odpowiednio 17.5% oraz 25.5% oocytów loszek LND i LD. Częstość apoptozy była istotnie wyższa wśród oocytów BCB+ (17.6%) niż BCB- (4.0%). Szczegółowa analiza oocytów kompetentnych (BCB+) wykazała, że istotnie więcej oocytów BCB+ loszek dojrzałych (85.3%) miała średnicę $>120\mu\text{m}$ w porównaniu z oocytami loszek niedojrzałych (52.7%). Częstość apoptozy była ponad 2-krotnie wyższa w oocytach BCB+ pozyskanych od loszek dojrzałych (24.2%) w porównaniu z LND (10.8%).

Podsumowanie. Dwa spośród trzech parametrów przyjętych w niniejszej pracy do oceny jakości oocytów świni (test BCB, średnica) charakteryzowały lepszą jakość oocytów pozyskanych z jajników loszek dojrzałych płciowo. Ta grupa loszek charakteryzowała się jednak wyższą częstością apoptozy, szczególnie w grupie BCB+. Ponadto jakość tej kategorii komórek w istotnym stopniu zależy od uzyskania dojrzałości płciowej przez dawkę.

ODCHÓW CIELĄT JELENIA SZLACHETNEGO I WYBRANE CECHY BEHAVIORU W OKRESIE ROZRODCZYM

REARING OF RED DEER CALVES AND CHOSEN TRAITS OF BEHAVIOUR DURING REPRODUCTION SEASON

Zygmunt Gizejewski¹ i Michael Mayntz²

¹ Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, 10-747 Olsztyn, ul. Tuwima 10, Zygmunt.Gizejewski@wp.pl

² Mälardalens Högskola, Department of Biology and Chemical Engineering, SE-631 05 Eskilstuna, Sweden, michaelm@bahnhof.se

Prowadzenie badań nad rozrodem jelenia szlachetnego w warunkach fermowych wymaga posiadania zwierząt odpowiednio oswojonych. W tym celu opisano procedury odchowu cieląt, które pozwalają na uzyskanie osobników obojga płci tolerujących bezpośredni kontakt z człowiekiem.

W czwartym dniu po urodzeniu, po okresie siary, cielaki odłączano od matek i przenoszono do zagrody, oddalenie której uniemożliwiało sensoryczny kontakt z innymi jeleniami. Od chwili odłączenia, przez okres 90 dni, cielęta były karmione mlekiem krowim, przy czym częstość stopniowo zmniejszano z 4 razy w ciągu dnia w pierwszym miesiącu, do jednego karmienia w trzecim miesiącu odchowu. W tym okresie cielęta wyprowadzano na spacer, zwiększając możliwość kontaktu z ludźmi. Do pobierania nasienia, przy zastosowaniu sztucznej pochwy, używano dorosłych płciowo łań prowokatorek, które były uspakajane niskimi dawkami (od 0,16 do 0,23 ml, iniekcje domięśniowe) 10% Rompunu (Xylazine), a dodatkowo ich zad spryskiwano moczem pobranym od łań w rui. Intensywność *libido* 5 byków w okresie pobierania nasienia, w trzech kolejnych sezonach rozrodczych, oceniano poprzez pomiar czasu stoperem; T1 - czas od wprowadzenia łań na zagrodę do pierwszego kontaktu byka z łąnią oraz T2 - czas od pierwszego kontaktu do oddania nasienia. Odnutowywano również agresywne zachowanie się byków w stosunku do obsługi, zgrzytanie zębami, flemen, tzw. chód równoległy, pozorowany i rzeczywisty atak poprzez ogrodzenie, spryskiwanie moczem podbrzusza oraz występowanie charakterystycznego zapachu feromonów. Intensywność ryczenia w ciągu dnia szacowano w skali trzystopniowej.

Zastosowane metody odchowu cieląt (imprinting), po uzyskaniu przez nie dojrzałości płciowej, pozwalają na prowadzenie doświadczeń wymagających częstego kontaktu i m.in. na kolekcję nasienia. Średni czas T1 za cały okres obserwacji wynosił około 30 sek, natomiast w okresie szczytu rykowiska (25 wrzesień - 23 październik) kontakt byka z łąnią był natychmiastowy. Średni czas T2 dla całego okresu obserwacji wynosił 1,5 minuty, natomiast w szczycie rykowiska wynosił średnio 30 sekund. Stwierdzono, iż młode byki (1,5 do 3 lat) cechuje większa ilość wspięć na łąnię do skutecznego pobrania nasienia oraz wydłużone czasy T1 i T2 w porównaniu do byków starszych. Pojawienie się zapachu feromonów odnotowano średnio 51 dni po wytarciu poroża, któremu zwykle towarzyszył odruch spryskiwania moczem podbrzusza. Najwyższą aktywność ryczenia odnotowywano ok. 2 - 3 tygodni wcześniej, niż stwierdzona najwyższa agresywność, którą byki wykazywały w drugiej połowie października.

W porównaniu do dzikich populacji jelenia szlachetnego, okres rozrodczy oraz związane z nim cechy behawioralne jeleni fermowych są znacznie wydłużone.

SEKRECJA STEROIDÓW PO EKSPOZYCJI KOMÓREK PĘCHERZYKOWYCH NA NATURALNĄ MIESZANINĘ POPs

STEROID SECRETION FOLLOWING EXPOSURE OF OVARIAN FOLLICULAR CELLS TO REAL LIFE POPs MIXTURES

E. Gregoraszczyk

Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

E-mail: ewa.gregoraszczyk@uj.edu.pl

Wstęp: Zanieczyszczenie środowiska trwałymi związkami organicznymi określanymi jako POPs (persistent organic pollutants), do których należą dioksyny, polichlorowane dwufenyle (PCBs), DDTs i przeciwpalne związki bromowane (BDEs) jest problemem globalnym. Zanieczyszczenia te zwykle występują w mieszaninach i dlatego problemem jest oszacowanie skutków zdrowotnych.

Cel pracy: 1) określenie wpływu trzech mieszanin POPs: a)- uzyskanej z wątroby dorsza żyjącego w Atlantyku (MMix), b)- uzyskanej z wątroby miętusa żyjącego w jeziorze Mjøsa (Mjøsa Mix) i c)- z wątroby miętusa żyjącego w jeziorze Losna (Losna Mix) z terenu czystego ekologicznie.; 2) określenie który ze związków występujących w najwyższym stężeniu w mieszaninie jest odpowiedzialny za obserwowane efekty.

Material i Metody: Kokultury komórek osłonki wewnętrznej i warstwy ziarnistej hodowano przez 48 godz z wrastającymi dawkami poszczególnych mieszanin (1,5,10,50,100,500,1000). Po zakończeniu hodowli w pożywce określono stężenie progesteronu, testosteronu i estradiolu. W Ekip 2- komórki poddawano działaniu zdefiniowanych mieszanin związków występujących w najwyższym stężeniu (PCB153, 138, 126, 108, DDT, DDE)

Rezultaty: Chemiczna analiza wykazała, że dominujące w MMix związki to PCB i DDT/DDE podczas gdy dominującymi w MjøsaMix były PBDEs. Najniższe stężenie wszystkich związków zanotowano w LosnaMix. Jakkolwiek wszystkie mieszaniny statystycznie istotnie stymulowały sekrecję steroidów z natężeniem MMix>Mjøsa Mix>Losna Mix. Dalsze badania wykazały, że niektóre związki wchodzące w skład mieszanin mogą działać synergistyczne a inne znosić estrogenne działanie innych.

Wniosek: Nawet mieszaniny zawierające niewielkie ilości POPs mogą zaburzać funkcje jajnika. Silne stymulacyjne działanie niskich dawek potwierdza "hormesis-dose response" tych związków. Komplikuje to możliwość przewidywania ryzyka narażenia na POPs. Ważnym stwierdzeniem jest fakt silnego estrogennego działania DDE. To właśnie ten związek obecny w każdej mieszaninie jest prawdopodobnie odpowiedzialny za estrogenne działanie mieszanin.

Finansowane częściowo przez DS/BiNoZ/IZ/KF/772/ 2006-2007

WPŁYW IZOFLAWONÓW SOJOWYCH PODAWANYCH PRE- I POSTNATALNIE NA AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH W KOMÓRKACH MĘSKIEGO UKŁADU PŁCIOWEGO SZCZURÓW

INFLUENCE OF SOYA ISOFLAVONES ADMINISTERED PRE- AND POSTNATALLY ON THE ACTIVITY OF SELECTED ANTIOXIDATIVE ENZYMES IN CELLS OF RATS MALE REPRODUCTIVE SYSTEM

¹Mariola Marchlewicz, ²Irena Baranowska-Bosiacka, ¹Katarzyna Piotrowska, ¹Agnieszka Kolasa, Anna Kondarewicz, ²Dariusz Chlubek, ¹Barbara Wiszniewska

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, ²Katedra Biochemii i Chemii Medycznej,
Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72
e-mail: mola@sci.pam.szczecin.pl

Cel pracy: Funkcję męskiego układu płciowego regulują oprócz androgenów również estrogeny. Obecnie w środowisku pojawia się coraz więcej ksenoestrogenów, które mogą naśladować lub maskować działanie estrogenów. Pojawiające się w środowisku ksenoestrogeny mogą poprzez zmianę poziomu estrogenów na terenie jądra i najądrza prowadzić do zaburzenia morfologii i funkcji tych narządów. Jednym z efektów, jakie obserwuje się po ekspozycji na fitoestrogeny, jest silny efekt antyoksydacyjny. Izoflawony sojowe działają jako wymiatacze wolnych rodników (efekt nieenzymatyczny), jak i zmieniają poziom niektórych enzymów antyoksydacyjnych w komórkach.

Celem pracy była wstępna ocena wpływu izoflawonów sojowych, podawanych od okresu prenatalnego aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej na aktywność i immunоекспресję dysmutazy nadadtlenkowej (SOD1), a także na aktywność peroksydazy glutationowej (GPX1), katalazy (CAT) i reduktazy glutationu (GR) w jądrach i najądrzach szczurów.

Materiał i metody: Ciężarnym samicom szczurów szczepu Wistar a następnie nowonarodzonym szczurom do ukończenia 3. miesiąca życia, podawano daidzeinę i genisteinę (MenoStop, HASCOLEK, SoyaMeno, Terpol), izoflawony sojowe o udowodnionym potencjale estrogenowym, w dawce 200mg/kg m.c./dobę p.o. Po zakończeniu doświadczenia szczury usypiano przy użyciu Thiopentalu (Biochemie GmbH, Austria) w dawce 200 mg/kg i.p. Pobrane jądra i najądrza przeznaczono do badań immunohistochemicznych i biochemicznych.

Oznaczanie aktywności enzymów: GPX1, SOD1, CAT, GR wykonano w homogenatach jąder i najądrzy, z wykorzystaniem standaryzowanych zestawów (Oxis, Polska). Wszystkie odczynniki zostały użyte ściśle wg instrukcji zawartej w zestawie. W celu zbadania immunоекспресji dysmutazy nadadtlenkowej w komórkach jąder i najądrzy preparaty histologiczne inkubowano przez 60 min. w temp. pokojowej z mysim monoklonalnym przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko SOD1 (NCL-SOD1, clone 30F11; Novocastra Lab. Ltd) w stężeniu końcowym 1:25. Dla uwidocznienia kompleksu antygen-przeciwciała zastosowano zestaw EnVision⁺System-HRP (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) opierający się na reakcji awidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa z diaminobenzydynam (DAB) jako chromogenem. Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym (Axioskop Zeiss, Niemcy). Jako pozytywny wynik reakcji uznano brązowy odczyn w cytoplazmie komórek. Dla sprawdzenia specyficzności wiązania przeciwciała pierwszorzędowego, wykonano reakcję z pominięciem tego przeciwciała.

Wyniki: Wykazano istotne zwiększenie aktywności peroksydazy glutationowej w homogenatach głowy najądrzy, katalazy w homogenatach głowy i ogona najądrzy szczurów traktowanych przed- a następnie po urodzeniu izoflawonami sojowymi. Zaobserwowano też istotnie wyższą aktywność CAT w homogenatach ogona w porównaniu do głowy najądrzy szczurów doświadczalnych. Nastąpił także istotny wzrost aktywności reduktazy glutationu (GR) zarówno w homogenatach głowy, jak i ogona najądrzy szczurów doświadczalnych, w porównaniu do kontrolnych. Istotnie zwiększyła się również aktywność dysmutazy nadadtlenkowej (SOD1) w badanych odcinkach najądrzy szczurów traktowanych izoflawonami sojowymi. Wynik ten był w zgodzie z uzyskanym w reakcji immunohistochemicznej, ze specyficznym przeciwciałem anty-SOD1. Wzór immunolokalizacji SOD1 u zwierząt doświadczalnych był podobny do uzyskanego w grupie zwierząt kontrolnych, ale nieco intensywniejszy.

Wnioski: Ekspozycja samców szczurów na izoflawony sojowe (daidzeinę i genisteinę), w dawce 200mg/kg m.c./dobę, od okresu prenatalnego aż do osiągnięcia pełnej dojrzałości płciowej ma znaczący wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych: SOD1, GPX1, CAT, GR w komórkach męskiego układu płciowego szczura.

WPLYW DAIDZEINY NA STEROIDOGENEZĘ I EKSPRESJĘ MRNA RECEPTORÓW ESTROGENOWYCH W KOMÓRKACH ZIARNISTYCH JAJNIKA ŚWINI

THE EFFECT OF DAIDZEIN ON STEROIDOGENESIS AND EXPRESSION OF THE ESTROGEN RECEPTORS MRNA IN PORCINE GRANULOSA CELLS

Anna Nynca, Olga Kraszevska, Renata Ciereszko

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; ul. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn, reniac@uwm.edu.pl

Cel pracy. Daidzeina, fitoestrogen występujący m. in. w soi, wpływa na procesy rozrodcze ludzi i zwierząt. Działanie daidzeiny może obejmować wpływ na jajnikową sekrecję hormonów steroidowych, przemiany steroidów oraz na ekspresję receptorów estrogenowych w komórkach steroidogenicznych. Celem doświadczeń było zbadanie wpływu daidzeiny na: 1/ podstawową i stymulowaną przez FSH produkcję progesteronu (P_4) i estradiolu (E_2) przez komórki ziarniste izolowane ze średnich pęcherzyków jajnikowych świni, 2/ żywotność hodowanych komórek ziarnistych, i 3/ ekspresję mRNA receptorów estrogenowych α i β ($ER\alpha$ i $ER\beta$) w badanych komórkach.

Material i metody. Komórki ziarniste izolowano ze średnich, rosnących (3-6 mm) pęcherzyków jajnikowych świni. Po hodowli wstępnej (48-72 godz.; 300 tys. komórek/ml; 20 tys. komórek/100 μ l lub 2 mln komórek/3 ml medium Eagle'a, 37°C, 95% powietrza, 5% CO_2), komórki hodowano z daidzeiną (0,05-50 μ M) i/lub FSH (100 ng) przez 48 godzin. Po zakończonej hodowli, metodą radioimmunologiczną oznaczano koncentrację P_4 i E_2 w medium hodowlanym. Żywotność komórek hodowanych w obecności daidzeiny badano przy użyciu spektrofotometrycznego testu alamarBlueTM. Ekspresję mRNA $ER\alpha$ i $ER\beta$ w komórkach ziarnistych oznaczano ilościową metodą RT-PCR przy użyciu specyficznych starterów dla $ER\alpha$ (liczba cykli: 40, temp. przyłączania starterów: 59°C) lub $ER\beta$ (liczba cykli: 38, temp. przyłączania starterów: 58°C). Produkty amplifikacji analizowano densytometrycznie za pomocą programu GelScan (wersja 1,45, Kucharczyk, Polska), a uzyskane dane liczbowe (jednostki gęstości optycznej – OD) wyrażono w postaci stosunku OD genu $ER\alpha$ lub $ER\beta$ do genu metabolizmu podstawowego GAPDH.

Wyniki. Daidzeina wykazywała hamujący ($p<0,05$), dawkozależny wpływ zarówno na podstawową, jak i stymulowaną przez FSH, produkcję P_4 . Nie wykazano natomiast wpływu tego fitoestrogenu na produkcję E_2 . Daidzeina, z wyjątkiem najwyższej dawki (50 μ M), nie zmieniała żywotności hodowanych komórek ziarnistych. Wykazano istotny ($p<0,05$), hamujący wpływ daidzeiny (0,5 i 5 μ M) na ekspresję mRNA $ER\alpha$. Nie zaobserwowano natomiast wpływu tego fitoestrogenu na ekspresję mRNA $ER\beta$.

Wnioski. Daidzeina może oddziaływać na funkcje rozrodcze samic poprzez wpływ na jajnikową steroidogenezę i aktywację receptorów estrogenowych.

Praca wykonana w ramach grantów: KBN 2 P06D 010 29, PBZ-KBN-084/P06/2002.5.9, UWM 522.0206.0206 oraz funduszy EFS (dla AN).

WPŁYW NISKICH DAWEK OŁOWIU NA IMMUNOEKSPRESJĘ I AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH W NAJĄDRZU DOJRZAŁYCH PŁCIOWO SZCZURÓW

INFLUENCE OF LOW LEAD DOSES ON ANTIOXIDANT ENZYMES IMMUNOEXPRESSION AND ACTIVITY IN ADULT RAT EPIDIDYMS

Monika Zawiaślak¹, Bartosz Zawiaślak¹, Irena Baranowska-Bosiacka², Barbara Wiszniewska¹, Agnieszka Kolasa¹, Dariusz Chlubek², Małgorzata Świder Al-Amawi¹, Mariola Marchlewicz¹

¹Katedra i Zakład Histologii i Embriologii oraz

²Katedra Biochemii i Chemii Medycznej

Pomorskiej Akademii Medycznej

70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72

e-mail: mola@sci.pam.szczecin.pl

CEL PRACY

Wieloletnie badania przeprowadzone w Zakładzie Histologii i Embriologii PAM dotyczące wpływu ołowiu (Pb) na układ płciowy samców szczurów Wistar wykazały, że pierwiastek ten bardziej uszkadza najądrze niż jądro. Przewlekła ekspozycja na Pb powodowała zwiększenie stężenia nadtlenków lipidów w homogenatach najądrza oraz będącą następstwem tego, wzmożoną chemiluminescencję (ultrasłaba emisja światła) z tych homogenatów oraz obniżenie zawartości kwasu askorbinowego w homogenatach najądrza. Zwiększenie ilości reaktywnych form tlenu oraz zmiany stężeń substancji o działaniu antyoksydacyjnym w najądrzu intoksykowanych zwierząt, w porównaniu do grupy kontrolnej, mogą świadczyć o zaburzeniu równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Z uwagi na ten fakt wykorzystano ekspozycję dojrzałych płciowo szczurów na ołów, jako modelowy przykład oddziaływania ksenobiotyków na najądrze - ważny odcinek męskiego układu płciowego.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta I grupy doświadczalnej otrzymywały przez 9 miesięcy (czas trwania 5 spermatogenez) do picia 1% wodny roztwór octanu ołowiu – $\text{Pb}/\text{CH}_3\text{COO}/_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice) (Pb), II grupy doświadczalnej otrzymywały 1% wodny roztwór octanu ołowiu z troloksem, rozpuszczalnym w wodzie analogiem tokoferolu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), (Sigma/Aldrich, Polska) w dawce 48 mg/L roztworu octanu ołowiu (Pb + troloks). Zwierzęta III grupy doświadczalnej otrzymywały do picia 1% wodny roztwór octanu ołowiu z tokoferolem (Medana, Polska) w dawce 200 mg/kg m.c./dobę (Pb + wit. E). Zwierzęta grup kontrolnych otrzymywały do picia odpowiednio wodę destylowaną (K), wodę destylowaną z troloksem (K+troloks), wodę destylowaną z tokoferolem (K+wit. E) w dawkach jak powyżej. Po zakończeniu doświadczenia szczury usypiano przy użyciu Thiopentalu (Biochemie GmbH, Austria) w dawce 200 mg/kg i.p. Pobrąną z serca krew przeznaczono do oznaczeń. Wypreparowane jądra i najądrza, po zważeniu, przeznaczono do badań immunohistochemicznych i biochemicznych.

Oznaczanie glutationu wykonano z wykorzystaniem standaryzowanego zestawu Bioxytech® GSH-400 (Oxis, Polska). Do badań przygotowano 10% homogenaty tkanek głowy i ogona najądrzy (w/v) w 5% roztworze kwasu metafosforowego (Sigma, Polska). Absorbancję mierzono przy długości 400 nm za pomocą termostatowanego spektrofotometru – Beckman DU 650). Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1), katalazy (CAT), reduktazy glutationu (GR) wykonano z wykorzystaniem standaryzowanych zestawów (Oxis, Polska). Wszystkie odczynniki zostały użyte ściśle wg instrukcji zawartej w zestawie.

W celu zbadania immunoekspresji dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach jąder i najądrzy preparaty histologiczne inkubowano 60 min. w temp. pokojowej z mysim monoklonalnym przeciwciałem pierwszorzędowym przeciwko SOD-1 (NCL-SOD1, clone 30F11; Novocastra Lab. Ltd) w stężeniu końcowym 1:25. Dla uwidocznienia kompleksu antygen-przeciwciało zastosowano zestaw EnVision⁺System-HRP (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) opierający się na reakcji avidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa z diaminobenzydynam (DAB) jako chromogenem. Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym (Axioskop Zeiss, Niemcy). Jako pozytywny wynik

reakcji uznano brązowy odczyn w cytoplazmie komórek. Dla sprawdzenia specyficzności wiązania przeciwciała pierwszorzędowego, wykonano reakcję z pominięciem tego przeciwciała.

WYNIKI

Przewlekła intoksykacja ołowiem nie wywołała klinicznych cech zatrucia. Masa ciała, jąder i najądrzy tych zwierząt nie różniły się od stwierdzonych w grupie kontrolnej. Traktowanie ołowiem spowodowało istotne zwiększenie stężenia Pb we krwi, homogenatach jąder oraz głowy i ogona najądrzy. Wykazano istotne zwiększenie aktywności CAT w głowie i istotne obniżenie aktywności katalazy w ogonie najądrzy szczurów traktowanych przewlekłe niskimi dawkami ołowiu. Ponadto wykazano istotne zwiększenie aktywności GR zarówno w głowie, jak i w ogonie najądrzy tych zwierząt, co mogło być przyczyną braku istotnych różnic w stężenia zredukowanego glutationu w tych tkankach. Aktywność SOD w badanych odcinkach najądrzy szczurów intoksykowanych Pb uległa istotnemu zwiększeniu, co znajdowało swoje odzwierciedlenie w immunoekspresji SOD w skrawkach najądrzy.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ ołowiu na zachwianie równowagi pro- i antyoksydacyjnej w najądrzu o czym mogą świadczyć zmiany aktywności enzymów utrzymujących tę równowagę. Zaobserwowane uszkodzenia i zmniejszenie liczby plemników w świetle przewodu najądrza intoksykowanych szczurów mogą świadczyć o niedostatecznym wyposażeniu najądrza w mechanizmy chroniące przed stresem oksydacyjnym (wywołanym przez przewlekłą intoksykację niskimi dawkami ołowiu).

KWAŚNE GLIKOZYDAZY JAJOWODU KURY BAŻANTA

ACID GLYCOSIDASES OF THE PHEASANT OVIDUCT

Dorota Błędniak , Bogusław Droba

*Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, Ćwiklińskiej 2,
35-601 Rzeszów, mdroba@univ.rzeszow.pl*

Celem pracy było oznaczanie aktywności właściwej i form wielopostaciowych kwaśnych glikozydaz jajowodu kury bażanta poza sezonem nieśności.

Materiałem badawczym były kury bażanta na wczesnym etapie zaprzestania znoszenia jaj. Wypreparowane jajowody dzielono na segmenty odpowiadające lejkowi, magnum, cieśni, gruczołowi skorupowemu i pochwie. Odcinki te homogenizowano, homogenaty odwirowywano a supernatanty zawierające rozpuszczone enzymy analizowano. Badano β -N-acetyloglukozaminidazę (β -HEX), β -galaktozydazę (β -GAL), α -galaktozydazę (α -GAL), α -glukozydazę (α -GLU), α -fukozydazę (α -FUK) i α -mannozydazę (α -MAN).

Aktywności właściwe kwaśnych glikozydaz oznaczano wg Barretta i Heatha, 1977 (Lysosomes: a laboratory handbook). W przypadku β -HEX, β -GAL, α -GAL i α -FUK najwyższa aktywność właściwa została stwierdzona w cieśni jajowodu, dla α -MAN i β -MAN w lejku i pochwie, natomiast dla α -GLU w cieśni i gruczole skorupowym.

Punkty izoelektryczne (pI) form wielopostaciowych glikozydaz wyznaczano stosując technikę chromatooogniskowania w gradiencie pH 6-4, wg broszury firmy Pharmacia „Chromatofocusing with Polybuffer™ and PBE™”. W większości przypadków punkty izoelektryczne (pI) form wielopostaciowych konkretnego enzymu były podobne dla różnych odcinków jajowodu kury bażanta. W przypadku β -HEX główne formy wykazywały wartości $pI \geq 6.0$ (te formy nie były wiązane na kolumnie) i w zakresie 5.55-5.41 oraz formy minorowe o pI 5.27-4.96; β -GAL – główne formy o pI w zakresie 4.86-4.55 oraz formy minorowe w zakresie 4.32-4.26; α -GAL – główne formy o pI 5.85-5.65 oraz formy minorowe o pI 5.4-4.86; α -GLU – główne formy o pI 5.19-4.73 oraz formy minorowe o pI ≥ 6.0 ; α -FUK – główne formy o pI w zakresie 5.65-5.38 a minorowe w zakresie 5.28-4.93; α -MAN – główne formy o pI 5.65-5.33, wyjątkowo dla cieśni i pochwy główne formy wykazywały odpowiednio pI 4.68 i 4.71.

Porównanie aktywności właściwej i form wielopostaciowych kwaśnych glikozydaz jajowodu kury bażanta poza sezonem nieśności z aktywnościami oraz formami tych enzymów w okresie pełnej nieśności – umożliwi stwierdzenie ewentualnych zmian spowodowanych obecnością jaja w różnych odcinkach jajowodu.

AKTYWNOŚĆ α - I β -MANNOZYDAZY W NASIENIU I NARZĄDACH ROZRODCZYCH KACZORA

ACTIVITY OF α - AND β -MANNOSIDASES IN SEMEN AND REPRODUCTIVE ORGANS OF THE DRAKE

Małgorzata Dżugan¹, Maria Droba¹, Julian Książkiewicz²

¹ Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, ul. Ćwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów, mdzugan@univ.rzeszow.pl

² Instytut Zootechniki, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice, jksiazkiewicz@izoo.krakow.pl

Po raz pierwszy określono aktywność α - i β -mannozydazy w nasieniu i narządach rozrodczych kaczora. Enzymy te należą do kwaśnych glikozydaz lizosomalnych, powszechnie występujących w nasieniu i tkankach męskiego układu rozrodczego, gdzie pełnią istotną rolę w procesach związanych z zapłodnieniem. Celem pracy było porównanie aktywności kwaśnych mannozydaz występujących w układzie rozrodczym kaczora i innych ptaków domowych.

Aktywność enzymów określano w plazmie nasienia i ekstrakcie plemników oraz w homogenatach jąder, najądrzy i nasieniowodów kaczora rasy pekin angielski w sezonie rozrodczym (czerwiec) i fazie spoczynkowej (październik). Poziom aktywności enzymów badano z wykorzystaniem syntetycznych p-nitrofenolowych substratów w optymalnych, ustalonych doświadczalnie, warunkach. Rozdział aktywności na formy wielopostaciowe przeprowadzono metodą chromatogniskowania i chromatografii anionowymiennej.

W sezonie rozrodczym najwyższe aktywności obu mannozydaz stwierdzono w najądrzu kaczora, niższe w jądrach, nasieniowodzie, plazmie nasienia i ekstrakcie plemników. W homogenacie najądrzy i ekstrakcie plemników aktywność β -mannozydazy przeważała nad aktywnością α -mannozydazy, inaczej niż w jądrach, nasieniowodzie i plazmie nasienia. W fazie spoczynkowej (ok. 45-krotna redukcja masy jąder) stwierdzono znaczny spadek aktywności obu badanych mannozydaz w narządach rozrodczych, przy czym największe różnice stwierdzono dla najądrzy. Metodą chromatogniskowania rozdzielono badane aktywności na frakcje różniące się wartością pI, wykazując wyraźne podobieństwo form wielopostaciowych β -mannozydazy (dwie formy) i α -mannozydazy (liczne formy) pochodzących z różnych źródeł, przy czym formy otrzymane dla obu enzymów z plazmy nasienia charakteryzowały się najniższymi wartościami pI. Metodą chromatografii anionowymiennej dla β -mannozydazy z jąder kaczora wykazano obecność formy specyficznej dla sezonu rozrodczego, podczas gdy profile elucyjne α -mannozydazy z jąder były podobne w sezonie rozrodczym i fazie inwolucji.

Pod względem występowania mannozydaz w układzie rozrodczym i nasieniu kaczor wykazuje duże podobieństwo do innych ptaków domowych. Analogiczne formy wielopostaciowe enzymów stwierdzone w plazmie nasienia i badanych narządach są dowodem na to, że sekrecja enzymów do nasienia zachodzi zarówno w jądrach jak i najądrzach kaczora. Wysoka aktywność α - i β -mannozydazy w tkankach układu rozrodczego w sezonie rozrodczym potwierdza ich udział w procesach związanych z dojrzewaniem plemników, a ich obecność w nasieniu- udział w procesach związanych z zapłodnieniem.

CHARAKTERYSTYKA NASIENIA GŁUSZCA (*TETRAO UROGALLUS* L.)

CHARACTERISTICS OF CAPERCAILLIES SEMEN (*TETRAO UROGALLUS* L.)

Ewa Łukaszewicz¹, Zenon Rzońca², Artur Kowalczyk¹

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Zakład Hodowli Drobi, Wrocław; artur.kowalczyk@up.wroc.pl

² Nadleśnictwo Wisła, Wisła

Celem badań była próba pobrania nasienia od głuszców (*Tetrao urogallus* L.) utrzymywanych systemem wolierowym oraz analiza uzyskanych ejakulatów.

Material i Metody: Badania prowadzono w kwietniu 2008 roku na terenie Wolierowej Hodowli Głuszcza należącej do Nadleśnictwa Wisła. Od dziewięciu osobników (czterech samców utrzymywanych z samicami, pięciu indywidualnie) nasienie pobierano trzy krotnie metodą masażu grzbietowo-brzusznego. W zależności od objętości uzyskanego nasienia zmierzono jego objętość, obliczono koncentrację plemników oraz oceniono obraz morfologiczny plemników.

Wyniki: Spośród dziewięciu ocenianych samców, pozytywną reakcję na masaż stwierdzono u ośmiu osobników, a od pięciu z nich uzyskano nasienie. U pozostałych samców bezpośrednio z narządu kopulacyjnego pobrano kroplę wydzieliny organu rozrodczego co pozwoliło na wykonanie preparatów histologicznych i ocenę morfologiczną plemników.

Obraz morfologiczny nasienia analizowanych głuszców

Nr ♂ pochodzenie	Wiek	Liczba ocenionych prób	Formy morfologiczne plemników					
			prawidłowo ukształtowane	rozdęte	załamane szyjki	zmiany we wstawce	inne formy	martwe
1.* Beskidy	6 lat	2	66,7	18,7	3,2	3,4	1,9	6,0
2.* Białoruś	7 lat	2	77,8	8,7	1,8	5,7	1,3	4,7
3.* Białoruś	6 lat	2	74,3	11,2	2,2	10,1	0,3	1,8
4.* Białoruś	6 lat	1	65,3	14,0	2,7	3,7	0,0	14,3
5.** Białoruś	7 lat	2	82,0	7,6	2,7	2,3	0,7	4,7
6.** Beskidy	1 rok	0	--	--	--	--	--	--
7.** Białoruś	1 rok	1	45,3	37,3	0,3	3,0	1,0	13,0
8.** Gorczański Park Narodowy	1 rok	2	74,2	11,8	3,7	3,8	0,7	5,8
9.** Białoruś	1 rok	1	68,5	13,5	2,0	8,3	0,2	7,5

* samce utrzymywane z samicami; ** samce utrzymywane indywidualnie

Objętość uzyskanego nasienia wahała się 20 do 100µl, a koncentracja plemników od $60 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ do $1,9 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$.

Wnioski: Przeprowadzone próby wskazują na możliwość wykorzystania metody masażu do pobierania nasienia od głuszców utrzymywanych w wolierach, zarówno z samicami jak i indywidualnie.

WPLYW EGZOGENNEJ TRIJODOTYRONINY NA EKSPRESJĘ GENÓW *HSD3B1* I *CYP19A1* W PĘCHERZYKACH JAJNIKOWYCH KURY

EFFECT OF EXOGENOUS TRIIODOTHYRONINE ON *HSD3B1* AND *CYP19A1* GENE EXPRESSION IN CHICKEN OVARIAN FOLLICLES

Katarzyna Pawłowska, Andrzej Sechman

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

Cel pracy: U ptaków trijodotyronina (T_3) reguluje tempo podstawowej przemiany materii oraz wpływa na funkcję wielu tkanek ustroju [1]. Wykazano, że w jajniku kury (*Gallus domesticus*) zachodzi ekspresja mRNA receptorów tarczycowych, co wskazuje na udział T_3 w regulacji czynności tego narządu [2]. Celem przeprowadzonych badań była próba odpowiedzi na pytanie, czy w pęcherzykach jajnikowych kury T_3 wpływa na ekspresję mRNA dwóch głównych enzymów procesu steroidogenezy: dehydrogenazy 3β -hydroksysteroidowej (3β -HSD, *HSD3B1*), konwertującej pregnenolon do progesteronu oraz aromatazy P450 (P450arom, *CYP19A1*) – przekształcającej testosteron do estradiolu.

Materiał i metody: Doświadczenia przeprowadzono na kurach *Hy-Line Brown* ($n=20$), które trzymano w cyklu świetlnym 14L:10D i żywiono *ad libitum*. Zwierzęta podzielono na 4 grupy: kontrolną (0.9% NaCl) i trzy doświadczalne otrzymujące 2 razy dziennie przez 7 dni iniekcje (i.p.) T_3 w dawce 15, 45 lub 135 $\mu\text{g/kg}$ m.c. Kury dekapitowano 12 h po ostatniej iniekcji T_3 , a następnie z jajnika pobierano białe pęcherzyki o średnicy 1-4, 4-6 i 6-8 mm oraz trzy największe pęcherzyki hierarchiczne (F3-F1; 25-36 mm), z których izolowano warstwę osłonki i warstwę ziarnistą metodą Gilberta. Ekspresję genów *HSD3B1* i *CYP19A1* w ścianie pęcherzyków określano metodą RT-PCR.

Wyniki:

(A) **białe pęcherzyki:** Wykazano, że podawanie przez 7 kolejnych dni T_3 : (1) zwiększa poziom mRNA *HSD3B1* w pęcherzykach 1-4 mm natomiast zmniejsza ekspresję mRNA tego enzymu w pęcherzykach o średnicy 4-6 i 6-8 mm, (2) nie wpływa na proces transkrypcji genu *CYP19A1* w poszczególnych klasach białych pęcherzyków;

(B) **żółte pęcherzyki:** W grupie otrzymującej najwyższą dawkę T_3 , ze względu na atrezję żółtych pęcherzyków i brak wyraźnej hierarchii pęcherzykowej nie izolowano pęcherzyków przedowulacyjnych. Dlatego wyniki przedstawiono dla grupy kontrolnej i dwóch grup traktowanych T_3 w dawkach 15 i 45 $\mu\text{g/kg}$ m.c. Stwierdzono, że podawanie T_3 : (1) zmniejsza ekspresję genu *HSD3B1* w warstwie ziarnistej pęcherzyków F2 i F1, (2) w dawce 15 $\mu\text{g/kg}$ m.c. istotnie zwiększa ekspresję mRNA *CYP19A1* w osłonce żółtych pęcherzyków F3-F1, natomiast dawka 45 $\mu\text{g/kg}$ m.c. stymuluje ekspresję tego genu w osłonce pęcherzyka F1.

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują, że podawanie egzogennej trijodotyroniny oddziałuje na proces steroidogenezy pęcherzykowej. Działanie to polega na modulowaniu ekspresji mRNA enzymów 3β -HSD i P450arom w warstwie ziarnistej i osłonce poszczególnych populacji pęcherzyków jajnikowych kury.

Badania wykonano w ramach grantu 2 P06D 031 29 (2005-2008)

- [1] McNabb F.M.A. (2000). Thyroids. [In:] Sturkie's Avian Physiology. G.C. Whittow (ed.). Academic Press, San Diego, 461-469.
[2] Sechman A., (2007). Acta Bioch. Pol. 54 (Supl. 1/2007), p. 68.

POZIOM HORMONÓW PŁCIOWYCH WE KRWI I GONADACH NOWOWYKLUTYCH KURCZĄT TRAKTOWANYCH TCDD W POCZĄTKOWEJ FAZIE EMBRIOGENEZY

SEX HORMONES CONCENTRATION IN BLOOD AND GONADS OF NEWLY-HATCHED CHICKS TREATED WITH TCDD AT THE BEGINNING OF EMBRYOGENESIS

Andrzej Sechman¹, Marcin W. Lis², Jerzy Niedziółka², Anna Hrabia¹, Janusz Rząsa¹

¹Katedra Fizjologii Zwierząt, E-mail: rzsechma@cyf-kr.edu.pl, ²Katedra Hodowli Drobii, Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków E-mail: rzlis@cyf-kr.edu.pl

Cel pracy: Nasze wcześniejsze badania wykazały, że iniekcja 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (TCDD) *in ovo* w początkowej fazie embriogenezy obniża wylęgowość i zmniejsza masę ciała wylęzonych piskląt [Lis i in. 2006]. Badania te pokazały również, że TCDD wpływa na stężenie hormonów płciowych: testosteronu (T) i estradiolu (E2) we krwi embrionów kurzych, a efekt działania badanej dioksyny zależy od płci, dnia embriogenezy oraz stosowanej dawki [Sechman i in., 2007]. Celem prezentowanych badań była próba odpowiedzi na pytanie czy ekspozycja embrionów na TCDD w początkowej fazie embriogenezy może wpłynąć na stężenie hormonów płciowych we krwi i gonadach nowo-wyklutych piskląt.

Materiał i metody: Doświadczenie przeprowadzono na 300 jajach wylęgowych kur linii nieśnej Hy-Line, które inkubowano w standardowych warunkach. W 6. dniu inkubacji jaja prześwietlono w celu odrzucenia jaj niezapłodnionych i zamarych. Wyselekcjonowane jaja z prawidłowo rozwijającymi się embrionami (n=220) podzielono na 4 grupy i iniekowano TCDD w dawkach 0 (kontrola), 2,5; 5 i 10 ng/jajo. Inkubację prowadzono w standardowych warunkach w inkubatorze Masalles 65 DIGIT. Pisklęta (n=20 z każdej grupy; 10 samców i 10 samic) dekapitowano w pierwszym dniu po wykluciu, pobierano krew i gonady (jądra i lewy jajnik). Próbkki osocza i pobrane tkanki zamrażano i przechowywano w temp. -20°C do czasu oznaczania hormonów. Stężenie hormonów płciowych: progesteronu (P4), T i E2 w osoczu krwi i homogenatach gonad oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA) stosując gotowe zestawy firmy DSL (USA).

Wyniki: Wykazano, że iniekcja TCDD 6. dniu embriogenezy istotnie ($P<0,05-0,01$): (1) obniżyła stężenie P4 i T w jądrach i krwi jednodniowych kogutków; zmianom tym towarzyszył istotny wzrost stężenia E2 we krwi, (2) zwiększyła stężenie P4 oraz istotnie obniżyła stężenie T i E2 w jajniku nowo-wyklutych kurek (efekt ten zależał od zastosowanej dawki dioksyny); we krwi obserwowano istotny wzrost poziomu T i E2.

Wnioski: Uzyskane wyniki dowodzą, że ekspozycja embrionów kurzych na działanie TCDD w początkowej fazie embriogenezy (tj. w okresie różnicowania się gonady bipotencjalnej) istotnie wpływa na syntezę i sekrecję hormonów płciowych przez gonady jednodniowych piskląt. Wyniki wskazują na bezpośredni wpływ dioksyn na ekspresję i/lub aktywność enzymów procesu steroidogenezy.

Badania wykonano w ramach DS-3243/KFZ i BW-2221/KHDZFiZ

[1] Lis M., Sechman A., Rybusińska K., Niedziółka J. (2006). XXXVI ESNA Annual Meeting, Iasi, Romania, Abstracts, 29.

[2] Sechman A., Lis M.W., Hrabia A., Niedziółka J., Rząsa J. XXXVII ESNA Annual Meeting, JINR-Dubna, Rosja, Abstracts, 22-23.

IDENTYFIKACJA MUTACJI PUNKTOWYCH W *LOCUS* GENU *GDF9* METODĄ SSCP U MACIOREK PLENNEJ OWCY OLKUSKIEJ*

PCR – SSCP ANALYSIS ON POLYMORPHISM OF THE *GDF9* GENE IN PROLIFIC OLKUSKA EWES

¹Urszula Kaczor, ¹Katarzyna Ropka-Molik, ²Anna Kozubska-Sobocińska

¹ Uniwersytet Rolniczy, Katedra Hodowli Owiec i Kóz, al. Mickiewicza 24/28, Kraków, rkaczor@cyf-kr.edu.pl;

² Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Balice, ul. Krakowska 1, akozubsk@izoo.krakow.pl

Plenność wysokoplennych ras owiec może mieć różne podłoże genetyczne, aczkolwiek u większości znanych ras m. innymi: owiec Booroola, Garole, Lacaune, Cambridge, Belclare są to mutacje w obrębie *loci* genów *BMPR-1B*, *BMP15* i *GDF9*. U maciorek pełnych owiec olkuskich, cechujących się najwyższą plennością spośród ras krajowych, nie występuje charakterystyczna dla owiec Booroola mutacja FecB identyfikowana w obrębie genu *BMPR-1B* (*ALK6*). Można przypuszczać, iż uwarunkowanie wysokiej plenności maciorek tej rasy może mieć wspólne podłoże z fenomenem plenności innych ras europejskich takich jak: Cambridge czy Belclare lub z niezidentyfikowanymi dotychczas mutacjami w genach leżących na chromosomach: X, 5 i 6 czyli odpowiednio: *BMP15*, *GDF9* i *BMPR-1B* (*ALK6*). Geny *GDF9* i *BMP15* należą do rodziny genów kodujących białka TGFβ (transformujący czynnik wzrostu beta), których ekspresję wykazano w jajniku.

Gen *GDF9* leżący u owiec w chromosomie 5 o wielkości 2.5kbp składa się z 2 eksonów, kodujących aktywną formę peptydu liczącą 135 aminokwasów. Analiza trzech fragmentów 2 eksonu genu *GDF9* przeprowadzona metodą SSCP u owiec Belclare i Cambridge wykazała 8 pojedynczych mutacji, z których 2 mutacje w pozycji 241 i 395 łańcucha nukleotydowego powodowały zmianę funkcji kodowanego białka. Tę ostatnią mutację oznaczoną FecG^H, której konsekwencją jest zamiana seryny w fenyloalaninę w 77 kodonie łańcucha aminokwasowego stwierdzono u osobników obu wymienionych ras. Tej mutacji przypisuje się istotną rolę w rozrodzie maciorek szacując, iż jedna kopia z mutacją FecG^H w genie *GDF9* powoduje wzrost stopnia owulacji o 2.0, natomiast zwierzęta homozygotyczne są jałowe. Mutacji FecG^H nie zidentyfikowano we wcześniejszych badaniach własnych u maciorek pełnej owcy olkuskiej, zatem celem pracy była identyfikacja mutacji punktowych w *locus* genu *GDF9* metodą PCR-SSCP.

Materiał badawczy stanowiło 50 maciorek i tryków pełnej owcy olkuskiej. Zwierzęta pochodziły z wiodących gospodarstw tej rasy, dysponujących dokumentacją hodowlaną dotyczącą parametrów użyteczności rozplodowej. Do badań wytypowano maciorki, od których uzyskiwano bardzo liczne mioty (6-7 jagniąt/miot) oraz o bardzo niskiej plenności (1-2 jagnięta/miot). Genomowe DNA izolowano przy użyciu kitu firmy Epicentre, natomiast fragmenty genu *GDF9* amplifikowano wykorzystując startery podane przez Hanrahan i in. 2004. Fragment intronu o wielkości 294bp oraz pierwszy odcinek eksonu 2 (296bp), rozdzielono w warunkach natywnej elektroforezy w aparacie DCodeTM System (Bio-Rad). Rozdział fragmentów obejmujących intron prowadzono w 10% żelu poliakrylamidowym (akrylamid/bisakrylamid 37:5:1), 25W, 12°C przez 3 godziny, natomiast dla eksonu 2 w żelu 10% (29:1), 25W, 14°C przez 4 godziny.

Przeprowadzona analiza rozdziału fragmentów renaturowanego DNA wykazała w obrębie intronu obecność trzech różnych genotypów oznaczonych AA, AB oraz BB o frekwencji odpowiednio: 0,79, 0,19 oraz 0,02. W pierwszym fragmencie eksonu 2 zidentyfikowano również trzy genotypy oznaczone AA, AB i BB o frekwencji odpowiednio: 0,16, 0,34 i 0,5. Wstępna analiza wyników wykazała u maciorek o wysokiej plenności życiowej 400–500% obecność pojawiających się z niską częstością genotypów AA i AB identyfikowanych w analizowanym fragmencie eksonu 2, oraz genotypu heterozygotycznego AB w badanym fragmencie intronu.

*Supported by the State Committee for Scientific Research, project NN 311 2445 33

IDENTYFIKACJA GLIKOPROTEIN CIĄŻOWYCH PAG U ŻUBRA EUROPEJSKIEGO (*BISON BONASUS* L.)

PREGNANCY-ASSOCIATED GLYCOPROTEINS (PAGS) IDENTIFIED IN THE EUROPEAN BISON (*BISON BONASUS* L.)

Jolanta Kiewisz^{1,*}, Noelita Melo de Sousa², Jean-Francois Beckers²,
Grzegorz Panasiewicz¹, Zygmunt Gizejewski³, Bożena Szafranska¹

¹ Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
ul. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn-Kortowo, panasg@uwm.edu.pl

² Katedra Fizjologii Rozrodu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet w Liege, B-4000 Liege, Belgia

³ Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Żubr należy do rodziny *Bovidae*, u którego powstaje synepiteliochorialne łożysko liścieniowate (kotyledonarne), a ciąża trwa dziewięć miesięcy. Celem badań było wyizolowanie, oczyszczenie i poznanie sekwencji aminokwasowej białek łożyskowych pozyskanych od samic żubra europejskiego w pierwszym trymestrze ciąży.

Materiał badawczy stanowiły tkanki kotyledonarne (45, 60, 85 oraz 120 dpc – dzień *post coitum*) żubrzych wyeliminowanych w Białowieckim Parku Narodowym. Białka kotyledonarne precypitowano i frakcjonowano chromatograficznie (VVA – *Vicia Villosa Agglutinin*). Pozyskane frakcje białkowe rozdzielano elektroforetycznie (1D- oraz 2D- PAGE) i analizowano heterologiczną metodą Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał wyprodukowanych przeciwko antygenom bydłowym (bPAG) oraz kozim (cPAG). Wyselekcjonowane frakcje (oczyszczone metodą VVA) sekwencjonowano metodą Edmana.

W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano 12 sekwencji białek kotyledonarnych, które zdeponowano w bazie EMBL-EBI (UniProt Knowledgebase; Accession numbers: P85328–P85330 oraz P85319–P85327). Wykryto dziewięć form sekrecyjnych białek PAG, które u żubra europejskiego nazwano EbPAG. W tkankach łożyskowych z 45 dpc zidentyfikowano trzy formy białek, które zostały nazwane: EbPAG_{67AkDa} (RGSNLTHPLRNIGDLFYVGN), EbPAG_{55BkDa} (RGSNLTHPL) oraz EbPAG_{50CkDa} (SQISLRGSNLTI). W tkankach łożyskowych z 60 dpc zidentyfikowano kolejne trzy formy białek PAG, które nazwano: EbPAG_{71DkDa} (RGSNLTIHPLRNIIDLFYVG), EbPAG_{55EkDa} (RGSNLTHPLRNI) oraz EbPAG_{50FkDa} (SQISLRGS). Trzy inne formy białek EbPAG zidentyfikowane w kotyledonach z 120 dpc nazwano: EbPAG_{71GkDa} (RGSNLTHPLRNIRDLFYVG), EbPAG_{60HkDa} (RGSNLTTTHPLRNIKDLVVYM) oraz EbPAG_{50IkDa} (SGSNLTTV). Sekwencje poznanych białek EbPAG są unikalne w porównaniu do innych białek PAG oczyszczonych poprzednio u innych gatunków zwierząt należących do rodziny *Bovidae*. Mikro-sekwencje białek EbPAG wykazują jednakże znaczące podobieństwo do wewnętrznych sekwencji aminokwasowych różnych prekursorów polipeptydowych PAG zidentyfikowanych *in silico* u bydła domowego na podstawie sekwencji nukleotydowych cDNA sklonowanych genów bPAG. Ponadto, trzy inne izoformy oczyszczono metodą VVA, a następnie zidentyfikowano sekwencje: EbUPG_{45kDaJ1} (SKDNYKNYIPLIVPFAT), EbUPG_{45kDaJ2} (SKDNQKNYIPLIVPFAT) oraz EbUPG_{76kDaK} (SPEFTV), które tymczasowo zostały nazwane UPG (*Unknown Placental Glycoproteins*), ponieważ nie wykazują podobieństwa do poprzednio poznanych sekwencji glikoprotein łożyskowych u przeżuwaczy.

Po raz pierwszy zidentyfikowano NH₂-terminalne sekwencje białek EbPAG oraz EbUPG wyizolowane z łożysk kotyledonarnych żubra europejskiego (*Bison bonasus* L.) znajdującego się w Czerwonej Księdze Gatunków Zagrożonych. Wszystkie wyizolowane białka EbPAG mogą być zastosowane jako markery do diagnozowania ciąży.

Finansowanie: Uniwersytet w Liege, FNRS/Belgium (CC 1.5.059.08), UWM w Olsztynie (528-0206.0805).

*J. Kiewisz otrzymuje stypendium Prezesa Polskiej Akademii Nauk (#4/S/2007).

WPLYW INTERFERONU -T (IFN-T) NA PRODUKCJĘ KORTYZOLU W KOMÓRKACH BŁONY ŚLUZOWEJ MACICY KROWY

EFFECTS OF INTERFERON-T (IFN-T) ON CORTISOL PRODUCTION BY THE BOVINE ENDOMETRIAL CELLS

Magdalena Majewska

¹, Hwa-Yong Lee², Kiyoshi Okuda², Dariusz J. Skarżyński¹

¹ Zakład Immunologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
10-747 Olsztyn skadar@pan.olsztyn.pl

² Laboratory of Reproductive Endocrinology, Graduate School of Natural Science & Technology,
Okayama University, Okayama, 700-8530 Japan

Wykazaliśmy we wcześniejszych badaniach, że kortyzol może modulować syntezę i uwalnianie prostaglandyn (PG) w macicy krowy *in vitro*, hamując przede wszystkim uwalnianie luteolitycznej PGF_{2α}. Celem pracy było wykazanie czy bydlęcy sygnał płodowy - interferonu-τ (IFN-τ) wpływa na produkcję i uwalnianie kortyzolu w śluzówce macicy krowy *in vitro*.

Materiał do badań stanowiły komórki nabłonka oraz warstwy łącznotkankowej izolowane ze śluzówki macicy krów rasy holsztyńsko-fryzyskiej będących we wczesnej fazie lutealnej cyklu rujowego (2-5 dzień). Macice pozyskiwane były po uboju zwierząt w rzeźni komercyjnej. Faza cyklu określona została na podstawie makroskopowej obserwacji jajników i macicy. Poszczególne rodzaje komórek izolowano enzymatycznie, a następnie, po oszacowaniu ich liczby, ocenie homogeniczności oraz żywotności, zakładano pierwotne hodowle komórkowe. Po osiągnięciu stadium pełnej konfluencji (5-6 dzień hodowli) komórki stymulowano przez 24 godziny kortyzonem (substrat dla reakcji enzymatycznej, w wyniku której powstaje kortyzol) w dawce 30 nM oraz IFN-τ w różnych dawkach i układach doświadczalnych. W zebranych mediach hodowlanych oznaczono stężenie kortyzolu metodą EIA. Natomiast w zebranych po hodowli komórkach określono: (1) ekspresję białka dla 11β-HSD1 (enzymu syntetyzującego kortyzol) metodą Western-Blot; (2) ekspresję genów dla enzymu 11β-HSD1 i 11β-HSD2 (odpowiedzialnego za odwrotną przemianę kortyzolu w nieaktywny kortyzon) metodą ilościową RT-PCR.

Wykazano, iż IFN-τ w dawce 30 ng/ml stymuluje aktywność 11β-HSD1 i produkcję kortyzolu w komórkach nabłonka oraz tkanki łącznej macicy krowy (P<0.05). Co więcej komórki stromy poddane stymulacji IFN-τ w dawkach 0.03 - 30ng/ml wykazywały w porównaniu z kontrolą wyższą ekspresję genów zarówno dla 11β-HSD1, jak i 11β-HSD2 (P<0.05). Interferon-τ w dawce 30 ng/ml wyraźnie wzmacniał ekspresję białek dla enzymu 11β-HSD1 (P<0.05).

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, iż IFN-τ może wpływać dodatnio na wzrost ekspresji i aktywności 11β-HSD1, powodując wzrost lokalnej syntezy kortyzolu w śluzówce macicy krowy. Z kolei kortyzol może mieć działanie antyluteolityczne przez selektywne hamowanie wydzielania luteolitycznej PGF_{2α} i/lub stymulowanie syntezy luteotropowej PGE₂ w śluzówce macicy krowy (badania w toku). Można przypuszczać, że glikokortykosteroidy dzięki swoim właściwościom luteotropowym i antyluteolitycznym oraz przeciwzapalnym mogą odgrywać rolę mediatorów/modulatorów działania sygnału zarodkowego (IFN-τ) w macicy krowy, umożliwiając podtrzymanie funkcji ciała żółtego i tym samym przyczyniając się do prawidłowego rozwoju wczesnej ciąży.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSW nr N 308 3279 33.

DYNAMIKA ZMIAN WZGLĘDNEGO POZIOMU RECEPTORA ESTROGENOWEGO ALPHA (ERALPHA) W MAKROFAGACH ŚLEDZIONOWYCH I MACICZNYCH MYSZY W PRZEBIEGU CYKLU PŁCIOWEGO I WE WCZESNEJ CIĄŻY

RELATIVE LEVEL OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA (ERALPHA) IN SPLENIC AND UTERAL MACROPHAGES DURING ESTRUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY

Anna Pięta¹, Tomasz Maj¹, Marek Bogacki², Marta Wasielak², Anna Chelmońska-Soyta¹

¹ *Laboratorium Immunologii Rozrodu, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław, ul. Weigla 12*

² *Pracownia Biologii Zarodka Instytut Rozrodu i Badań Żywności PAN w Olsztynie, ul. Tuwima 10*

CEL PRACY: Makrofagi jako komórki prezentujące antygen i obdarzone zdolnością produkcji licznych cytokin są istotnymi komórkami biorącymi udział w regulacji zjawisk immunobiologicznych w ciąży. Podlegają one wpływowi hormonów płciowych, w tym estrogenów, które działają za pośrednictwem receptorów estrogenowych, głównie receptora estrogenowego alfa (ERalfa). Celem eksperymentu było ilościowe zbadanie zmian poziomu ERalfa w makrofagach F4/80-pozytywnych izolowanych z macicy i śledziony myszy w trakcie cyklu płciowego i we wczesnej ciąży. Zbadano również wpływ nasienia na poziom ERalfa w tych komórkach.

MATERIAŁY I METODY: Samice myszy szczepu C57BL/6J były utrzymywane w stałym cyklu światła i ciemności (12h:12h) w warunkach SPF. Fazy cyklu płciowego oznaczano na podstawie cytologii wymazów z pochwy, pobieranych codziennie w godz. 8:00 - 10:00. Komórki macicy i śledziony izolowane były od zwierząt w poszczególnych fazach cyklu oraz od samic w ciąży (0,5 dnia, 3,5 dnia i 4,5 dnia) lub w pseudociąży (0,5 dnia i 3,5 dnia) indukowanej stymulacją mechaniczną szyjki macicy. Komórki śledzionowe izolowano poprzez przetarcie narządu i lisę erytrocytów w izotonicznym roztworze chlorku amonu, natomiast komórki macicy uzyskano po rozdrobnieniu tkanki i trawieniu enzymatycznym (kolagenaza+DNaza). Poziom ERalfa oznaczano ilościową metodą cytofluorometryczną w makrofagach barwionych powierzchniowo w kierunku F4/80 oraz MHC klasy II. Analizę statystyczną przeprowadzono metodą analizy wariancji.

WYNIKI: Komórki F4/80+ wykazywały obniżony poziom ERalfa w fazie estrus zarówno w śledzionie, jak i w macicy, jednak obserwowane zmiany były nieistotne statystycznie. W 4,5 dniu ciąży (okres okołoinplantacyjny) poziom ERalfa był silnie zróżnicowany pomiędzy osobnikami. Wpływ nasienia okazał się być najlepiej widoczny w przypadku makrofagów śledzionowych F4/80+MHC II+ u myszy w 0,5 dniu ciąży (istotny statystycznie wzrost u myszy krytych w porównaniu z myszami w pseudociąży), przy czym różnice te zanikały w dniu 3,5. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w przypadku makrofagów F4/80+MHC II-.

Wykazano korelację dodatnią pomiędzy liczbą komórek MHC+ i względnym poziomem ERalfa
WNIOSKI:

Obecność nasienia w drogach rodnych samicy prowokuje reakcje w komórkach prezentujących antygen w systemowym układzie odpornościowym

Badania finansowane przez Sieć Naukową MNiSW nr 20/E183/SN0013

WSTĘPNE BADANIA NAD IZOLACJĄ I HODOWLĄ KOMÓREK NABŁONKOWYCH, ŁĄCZNOTKANKOWYCH I ŚRÓDBŁONKOWYCH Z MACICY KOTA DOMOWEGO

PRELIMINARY STUDIES ON ISOLATION AND CULTURE OF THE EPITHELIAL, STROMAL AND ENDOTHELIAL CELLS FROM THE UTERUS OF DOMESTIC CAT

Siemieniuch Marta J., Skarżyński Dariusz J.

*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Zakład Immunologii Rozrodu, Olsztyn, ul. Tuwima 10, 10-747
e-mail: martas@pan.olsztyn.pl*

W chwili obecnej brak jest szczegółowych danych dotyczących lokalnych, immuno-endokrynnych regulacji zachodzących w narządzie rozrodczym kota domowego, szczególnie na poziomie komórkowym, receptorowym i molekularnym. Mimo prowadzonych od lat 70-tych ubiegłego wieku badań nad uzyskiwaniem i konserwacją nasienia, wykorzystaniem nasienia do celów sztucznej inseminacji, zapłodnieniem *in vitro*, brak jest powszechnego zastosowania technik biotechnologicznych w rozrodzie kotowatych. Wpływ hormonów i wielu innych substancji przekaznikowych, mogących odgrywać rolę w dojrzewaniu pęcherzyka i owulacji, w tworzeniu i trwaniu ciała żółtego (CL), wczesnego rozwoju i implantacji zarodka u kotki nie został poznany. Brak jest również danych na temat regulacji funkcji wydzielniczych i strukturalnych komórek błony śluzowej macicy. Celem prezentowanych doświadczeń wstępnych jest opracowanie modelu do badań nad interakcjami immuno-endokrynnymi w macicy kota domowego.

Macice do badań zostały pobrane od klinicznie zdrowych kotek, o nieznannej historii reprodukcyjnej, podczas rutynowego zabiegu ovariohisterektomii. Faza cyklu została ustalona na podstawie makroskopowej oceny powierzchni jajników oraz macicy. Do każdego rogu macicy, zarówno od strony jajnika jak i trzonu macicy, wprowadzano kateter. Jeden kateter zmykano peanem, a poprzez drugi wprowadzono do światła rogu macicy roztwór enzymów: 1-2 ml roztworu enzymatycznego (*Hank's Balanced Salt Solution-HBSS*, pH=7.4 z dodatkiem dispazy I, kolagenazy I, DN-azy IV i 0.1% BSA). Komórki nabłonkowe otrzymano w wyniku dwukrotnej izolacji rogów macicy przez 40 i 20 minut, w temperaturze 37.5°C w łaźni wodnej z wytrząsarką. Zawiesinę komórek uzyskaną z obu trawień wirowano w gradiencie prędkości i następnie zawieszano w medium hodowlanym. Po izolacji komórek nabłonkowych, rogi macicy rozcinano w celu izolacji komórek łącznotkankowych. Wewnętrzną warstwę delikatnie zdejmowano przy użyciu skalpela i zawieszano w 10-20 ml roztworu trawiącego, opisanego powyżej. Komórki zbierano po 20, 40 i 60 minutach trawienia. W celu izolacji komórek śródbłonkowych rogi maciczne rozdrabniano i inkubowano w roztworze trawiącym opisanym powyżej. Czysta populacja komórek śródbłonka została uzyskana przy wykorzystaniu kulek magnetycznych pokrytych lektyną BS-1 (Dynabeads M-450 Dynal Inc.; # 140.03). Do hodowli komórek nabłonkowych, łącznotkankowych oraz śródbłonkowych zostały użyte płytki 24-dółkowe (Becton Dickinson, USA, Multiwell™; # 353047). Początkowa koncentracja komórek wynosiła 2×10^5 /ml. Medium hodowlane zmieniane było co 2 dni, do momentu osiągnięcia stadium konfluencji. Czystość hodowli komórek pierwotnych poszczególnych typów została potwierdzona immunofluorescencyjnie. Immunolokalizacja wimentyny została użyta do wyznakowania komórek nabłonkowych i potwierdzenia skuteczności izolacji. Immunolokalizację cytokeratyny wykorzystano do wyznakowania komórek łącznotkankowych. Immunolokalizację czynnika VIII (czynnik von Willebranda) wykorzystano do wyznakowania komórek śródbłonka. Docelowo opracowane modele hodowli komórek śluzówki macicy *in vitro* pozwolą rozpocząć badania nad rozwojem zarodka *in vitro* oraz będą podstawą do dalszych badań nad przebiegiem procesów fizjologicznych i patologicznych w narządach rozrodczych, a w szczególności macicy, kota domowego..

Badania wykonano w ramach Projektu Badawczego MNiSW N308 031 934

¹Marta Siemieniuch jest beneficjentem stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej

REAKTYWNOŚĆ IZOLOWANYCH GAŁĄZEK TĘTNICY MACICZNEJ I JAJNIKOWEJ ŚWINI NA $\text{PGF}_2\alpha$ I PGE_2 W RÓŻNYCH FAZACH CYKLU RUJOWEGO I WE WCZESNEJ CIĄŻY

EFFECT OF $\text{PGF}_2\alpha$ AND PGE_2 ON ISOLATED BRANCHES OF UTERINE AND OVARIAN ARTERY IN DIFFERENT PHASES OF ESTROUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY IN PIGS

Janina Skipor, Marzena Pikulińska, Stanisława Stefańczyk-Krzyszowska

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie

U świń, $\text{PGF}_2\alpha$ odpływająca z macicy jest gromadzona przez tkanki krezki macicy i następnie zwrotnie transportowana do macicy z krwią tętniczą w fazie ciała żółtego i we wczesnej ciąży. Ostatnio wykazano, że w okresie wczesnej ciąży ma miejsce zarówno zwrotny domaciczny, jak i lokalny dojajnikowy transfer PGE_2 . Proces lokalnego transferu hormonów z krwi żyłnej i limfy do tętnicy stanowi swoisty rodzaj komunikacji między sąsiadującymi naczyniami w obrębie więzadła szerokiego macicy, która umożliwia lokalne działanie czynników syntetyzowanych w macicy, łożysku lub zarodku bezpośrednio na naczynia tętnicze więzadła szerokiego macicy.

Cel badań: określenie wpływu $\text{PGF}_2\alpha$ i PGE_2 na napięcie tętniczek zaopatrujących macicę (t. maciczne) oraz tętniczek spłotu podjajnikowego (t. jajnikowe) w cyklu rujowym i we wczesnej ciąży.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono na izolowanych gałązkach t. macicznej i jajnikowej pobranych po uboju od zwierząt w fazie lutealnej (10-12 d) i pęcherzykowej (17-21 d) cyklu oraz we wczesnej ciąży (10-12 d). Pierścienie naczyniowe (3 mm) przygotowywano do pomiaru skurczu izometrycznego. Po wstępnym okresie kalibracji naczynia poddawano działaniu $\text{PGF}_2\alpha$ w dawce od 10^{-9} do 10^{-4} mol/l a PGE_2 w dawce od 10^{-9} do 10^{-5} mol/l.

Wyniki: Zarówno w t. macicznych, jak i jajnikowych obserwowano zależne od dawki, kurczące działanie $\text{PGF}_2\alpha$ we wszystkich badanych okresach. Maksymalne napięcie rozwijane przez t. maciczne stanowiło odpowiednio 88%, 92% i 83% napięcia rozwijanego przez te naczynia pod wpływem KCl, w fazie pęcherzykowej i lutealnej cyklu oraz we wczesnej ciąży. Wpływ $\text{PGF}_2\alpha$ na napięcie t. jajnikowych był odpowiednio na poziomie 96%, 110% i 94%. Dawka efektywna $\text{PGF}_2\alpha$ (ED_{50}) dla t. macicznych wynosiła odpowiednio $8,0 \times 10^{-6}$ i $6,3 \times 10^{-6}$ mol/l w fazie lutealnej i pęcherzykowej cyklu oraz $5,0 \times 10^{-6}$ mol/l we wczesnej ciąży. Z kolei dla t. jajnikowych ED_{50} dla $\text{PGF}_2\alpha$ wynosiła w tych trzech fazach odpowiednio $1,2 \times 10^{-5}$ i $3,1 \times 10^{-6}$ oraz $2,7 \times 10^{-6}$ mol/l. Tętniczki maciczne reagowały na PGE_2 niewielkim, w stosunku do $\text{PGF}_2\alpha$, wzrostem napięcia na poziomie 25% i 14% napięcia rozwijanego pod wpływem KCl, odpowiednio w fazie lutealnej cyklu i we wczesnej ciąży. Natomiast w t. jajnikowych, napięcie wzrosło w tych fazach odpowiednio do poziomu 61% i 49,7% oraz 8,5% w fazie pęcherzykowej cyklu. ED_{50} dla PGE_2 w t. macicznych określono na poziomie $5,0 \times 10^{-7}$ i $4,1 \times 10^{-7}$ mol/l, odpowiednio w fazie lutealnej cyklu i we wczesnej ciąży. Z kolei w t. jajnikowych ED_{50} dla PGE_2 wynosiła odpowiednio $7,3 \times 10^{-7}$ i $1,7 \times 10^{-7}$ mol/l.

Podsumowując, zarówno $\text{PGF}_2\alpha$ jak i PGE_2 działają na izolowane t. maciczne i jajnikowe świń kurcząco. Wrażliwość t. macicznych na kurczące działanie $\text{PGF}_2\alpha$ nie jest zależna od fazy cyklu rujowego ani wczesnej ciąży, natomiast drażliwość tych tętniczek na PGE_2 zależy od fazy cyklu. Wrażliwość t. jajnikowych zarówno na kurczące działanie $\text{PGF}_2\alpha$ jak i PGE_2 jest zależna od fazy cyklu oraz w odniesieniu do $\text{PGF}_2\alpha$ również od wczesnej ciąży.

EKSPRESJA AKWAPORYN W UKŁADZIE ROZRODCZYM LOSZEK

EXPRESSION OF AQUAPORINS IN REPRODUCTIVE TRACT OF GILTS

Mariusz T. Skowroński¹, Søren Nielsen²

¹Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczipowskiego 1A, 10-957 Olsztyn, e-mail: skowron@uwm.edu.pl, ²The Water and Salt Research Center, Institute of Anatomy, University of Aarhus, Aarhus, Denmark

Akwaporynowe kanały wodne tzw. akwaporyny (AQPs), są integralnymi białkami błon plazmatycznych tworzącymi kanały selektywne dla wody w wielu komórkach zwierzęcych. W organizmie ssaków AQPs odgrywają ważną rolę w utrzymaniu wodnej homeostazy. Do chwili obecnej zidentyfikowano u ssaków 13 isoform tego białka, a niektóre z nich na przykład AQP1, 2, 3, 4, 5, 8 i 9 w układzie rozrodczym samicy. Przepływ płynów przez błony w komórkach macicy wydaje się być bardzo istotny podczas cyklu rujowego/menstruacyjnego oraz w czasie implantacji i ciąży, stąd próba podjęcia tej tematyki przez niektóre ośrodki badawcze. Jednak obecny stan wiedzy na temat ekspresji i roli akwaporynowych kanałów wodnych w macicy jest bardzo fragmentaryczny i dotyczy głównie gryzoni. Brak jest danych na temat występowania i roli AQPs u zwierząt gospodarskich (w tym u świni) w czasie cyklu i ciąży.

Celem badań było ustalenie czy w jajniku, jajowodzie i macicy świni zachodzi ekspresja białka akwaporyn.

Materiały i metody. Tkanki z późnej fazy pęcherzykowej (18-19 dzień cyklu) pobrano od zwierząt poubojowo. W celu określenia ekspresji białka akwaporyn zastosowano analizę Western blot, natomiast parafinowe skrawki posłużyły do immunoperoksydazowej lokalizacji tych białek. W badaniach użyto przeciwciała anty-AQP1, -AQP2, -AQP3, -AQP5, -AQP7, -AQP8, -AQP9, -AQP10, -AQP11 i -AQP12.

Wyniki przeprowadzonych analiz immunologicznych pozwoliły stwierdzić obecność AQP1, AQP5 i AQP9 w tkankach układu rozrodczego loszek. Ekspresję białka AQP1 wykazano w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych jajnika, jajowodu i macicy. Ponadto, ekspresję białka AQP5 zlokalizowano w komórkach nabłonka powierzchniowego pęcherzyków pierwotnych i komórkach warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego. W jajowodzie ekspresję AQP5 stwierdzono w komórkach mięśni gładkich i części szczytowej komórek nabłonka. Wykazano również ekspresję tego białka w komórkach mięśniowych macicy i nabłonku endometrium. Natomiast, ekspresję białka AQP9 wykazano w komórkach warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego oraz komórkach nabłonka jajowodu. Ponadto, ekspresję AQP9 zlokalizowano w komórkach nabłonka gruczołów macicznych.

Wnioski. Wykazano po raz pierwszy ekspresję białka AQP1, AQP5 i AQP9 w tkankach jajnika, jajowodu i macicy świni. Przeprowadzone badania sugerują rolę AQPs w wodnej homeostazie w tkankach układu rozrodczego świni. Dalsze badania są jednak niezbędne w celu poznania fizjologicznej roli tych białek w procesach rozrodczych.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego MNiSW N N308 0042 33

WPLYW WYCISZENIA GENÓW SYNTAZ PROSTAGLANDYNY E2 I F2 α NA ICH EKSPRESJĘ ORAZ SEKRECJĘ PROSTAGLANDYN PRZEZ KOMÓRKI SK-6

EFFECT OF GENE SILENCING OF PROSTAGLANDIN E2 AND PROSTAGLANDIN F2 α SYNTHASES ON THEIR EXPRESSION AND PROSTAGLANDIN SECRETION IN SK-6 CELLS

Agnieszka Waclawik¹, Jan Kłos¹, Katarzyna Gromadzka-Hliwa¹, Adolfo Rivero-Muller²,
Nafis A. Rahman², Adam J. Zięcik¹

¹*Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn,
e-mail: waclawik@pan.olsztyn.pl*

²*Department of Physiology, University of Turku, 20520 Turku, Finland*

Prostaglandyny produkowane w endometrium macicy odgrywają istotną rolę w regulacji cyklu rujowego i ustaleniu ciąży. Sekwencje cDNA genu syntazy prostaglandyny F2 α (PGFS) oraz syntazy prostaglandyny E2 (mPGES-1) świni zostało niedawno sklonowane i scharakteryzowane (Waclawik i wsp., *Endocrinology*, 147:210-221, 2006). Celem badań było opracowanie metodyki wyciszania genów PGFS i mPGES-1 przy użyciu siRNA oraz funkcjonalna charakterystyka linii komórkowych nerki świni (SK-6) po wyciszeniu tych genów.

Ustalenie metodyki polegało na optymalizacji i przeprowadzeniu następujących etapów doświadczenia: (1) stworzenie konstruktów do produkcji siRNA w komórkach w oparciu o wektor pSuper, pod kontrolą promotora H1 RNA polimerazy III; (2) transfekcja komórek SK-6 przy wykorzystaniu Lipofectamine i Genepor; (3) selekcja transfekowanych komórek poprzez hodowle z wykorzystaniem neomycyny; (4) określenie poziomu wyciszenia genu lub jego produktów za pomocą metod Real-time PCR, analizy Western blot i EIA.

Prowadzone dotychczas prace doprowadziły do stworzenia dwóch konstruktów #PGFS1 i #PGFS2, służących do wyciszenia genu PGFS metodą siRNA. Do sprawdzenia ich skuteczności wykorzystano linię komórkową SK-6 posiadającą endogenną ekspresję genów enzymów syntezy prostaglandyn. Większe zahamowanie syntezy PGF2 α zaobserwowano przy użyciu konstruktu #PGFS2. Wykazano, że ekspresja genu syntazy prostaglandyny F2 α , białka PGFS i sekrecji PGF2 α w wyniku wyciszenia genu PGFS konstruktem #PGFS2 została obniżona odpowiednio o 70% ($p < 0,001$), 53% ($p < 0,05$) oraz 90% ($p < 0,0001$) w porównaniu z kontrolą. Ponadto, wykorzystanie konstruktów kodujących siRNA dla syntazy prostaglandyny E2 spowodowało wyciszenie ekspresji mRNA mPGES-1 i sekrecji PGE2 ($p < 0,05$).

Opracowanie metodyki wyciszania genów enzymów syntezy prostaglandyn metodą siRNA umożliwi stworzenie modelu do badań mechanizmów związanych z syntezą prostaglandyn w endometrium oraz ich roli w procesie rozpoznania ciąży u świni.

WPLYW AGONISTÓW I ANTAGONISTÓW RECEPTORÓW BETA ADRENERGICZNYCH NA AKTYWNOŚĆ SKURCZOWĄ MIĘŚNIÓWKI MACICY SZCZURÓW W BADANIACH *IN VITRO*

THE INFLUENCE OF β – ADRENERGIC RECEPTORS ON UTERUS MOTILITY IN THE RAT IN *IN VITRO* RESEARCH

Albert Czerski, Wojciech Zawadzki, Edyta Wincewicz, Marcin Zawadzki¹, Maciej Janeczek,
Marek Włodarczyk

Czasopismo Acta Scientiarum Polonorum - Medicina Veterinaria (Weterynaria), nr 3 (1) 2004, str. 9–18

Słowa kluczowe : kurczliwość macicy, szczur, receptory β -adrenergiczne

Streszczenie : Badania przeprowadzono na 15 szczurkach linii Bufflo w wieku 4–6 miesięcy. Zwierzęta poddawano narkozie halotanowej i pośmiertnie pobierano do badań skrawki macicy o długości od 1,5 do 2 cm. Skrawki montowano w komorach automatycznej łaźni wodnej. Po 30-minutowym zapisie spontanicznej aktywności skurczowej mięśniówki macicy podawano do komory: salbutamol w dawce 5 μ g na komorę, dobutaminę w dawce 25 μ g, propranolol w dawce 100 μ g, izoprenalinę w dawce 10 μ g, adrenalinę w dawce 0,01 mg na komorę. Dawki preparatów ustalano doświadczalnie. Pobudzenie receptorów β_1 -adrenergicznych selektywnym agonistą dobutaminą powodowało zanik spontanicznej kurczliwości (atonię) mięśniówki macicy. Natomiast zablokowanie receptora propranololem – antagonistą obu podtypów receptorów adrenergicznych (β_1 i β_2) powodowało zniesienie hamującego wpływu dobutaminy na zapis kurczliwości mięśniówki macicy. Pobudzenie receptorów β_2 -adrenergicznych selektywnym agonistą salbutamolem również powodowało natychmiastowy zanik kurczliwości wyizolowanego skrawka, a zablokowanie receptorów propranololem powodowało zniesienie hamującego wpływu salbutamolu na kurczliwość. Podanie izoprenaliny – agonista receptora β_1 i β_2 , jak i adrenaliny – agonista α i β receptorów adrenergicznych hamowało kurczliwość macicy. Wyniki doświadczeń sugerują obecność obu podtypów receptorów β -adrenergicznych w mięśniówce macicy szczurów. Pobudzenie receptorów β -adrenergicznych selektywnym agonistą powoduje zanik kurczliwości (atonię) wyizolowanego skrawka macicy.

Lek.wet. Marcin Zawadzki
doktorant
51-664 Wrocław
Katedra i Klinika Rozrodu,
Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony
Zdrowia Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy we
Wrocławiu
Plac Grunwaldzki 49
50-366 Wrocław
artest@wp.pl