Postępy nauk rolniczych

3/2007

Polska Akademia Nauk
Wydział Nauk
Rolniczych, Leśnych
i Weterynaryjnych

Dwumiesięcznik
nr 328 rok 59

Rada Redakcyjna
A. Grzywacz (przewodniczący),
Z. Gertych, J. Haman, T. Krzymowski, J.J. Lipa
A. Rutkowski, F. Tomczak, M. Truszczyński, J. Wilkin

Redakcja
A. Horubała (redaktor naczelny),
J. Buliński, T. Brandyk, A. Gawrońska-Kulesza, W. Kamiński,
J. Zimny, T. Żebrowska,
R. Suska (sekretarz redakcji)

Adres Redakcji
00-901 Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, pokój 2102
tel. 826-05-87, 656-60-17
e-mail: Wydzial5@pan.pl

Wydanie publikacji dofinansowane przez Mimisterstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Opracowanie redakcyjne, korekta i skład — Danuta Borecka

PL ISSN 0032-5547

Nakład 200 egz. Ark. wyd. 12. Ark. druk. 9,5.
Skład — DABOR 02-795 Warszawa ul. Kazury 22/27,
tel. 0 22 649-18-99, 600-37-29-29
Druk — Warszawska Drukarnia Naukowa PAN,
00-656 Warszawa ul. Śniadeckich 8, tel./faks 0 22 628 87 77

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 3–5

Seminarium „Problemy poznawcze i aplikacyjne w rozrodzie zwierząt”

Wprowadzenie

Okres 25-letniej działalności Komitetu Biologii Rozrodu Zwierząt Polskiej Akademii Nauk, utworzonego z inicjatywy prof. dr hab. Władysława Bielańskiego czł. rzecz. PAN, przyczynił się nie tylko do integracji środowiska naukowego specjalizującego się w problemach biologii reprodukcyjnej, ale również spowodował znaczny wzrost znaczenia międzynarodowego polskich zespołów naukowo-badawczych reprezentujących nauki rolnicze, przyrodnicze, weterynaryjne i medyczne.

Efekty badawcze omawianych zespołów publikowane są w renomowanych czasopismach naukowych oraz uzyskują wysoki wskaźnik liczby cytowań w piśmiennictwie światowym. Stanowią zarazem podstawę do stwierdzenia faktu powstania i dynamicznego rozwoju polskiej szkoły naukowej w zakresie biologii rozrodu.

Organizatorskie i merytoryczne aspekty funkcjonowania w polskiej nauce dyscypliny „biologia rozrodu” stanowiły istotną przesłankę do organizacji przez Wydział Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN Seminarium pt.: „Problemy poznawcze i aplikacyjne w rozrodzie zwierząt”. Seminarium, które odbyło się 25 października 2006 r. w Warszawie, z udziałem ponad 80 uczestników, obejmowało 8 referatów naukowych dotyczących, przede wszystkim, rozrodu zwierząt użytkowych. Uznano bowiem, że osiągnięcia nauki polskiej w tym obszarze badań stanowią podstawę współczesnych i przyszłych kierunków postępu genetycznego w hodowli oraz tworzenia nowych metod produkcji zwierzęcej.

Wykład inaugurujący Seminarium, wygłoszony przez prof. dr hab. Adama Zięcika, czł. koresp. PAN, wskazał na aktualne priorytety badawcze w świecie w dziedzinie biologii rozrodu ssaków. Za najważniejsze uznano zagadnienia dotyczące biotechnologii i biotechniki rozrodu oraz badania wyjaśniające funkcję gonad. Autor w oryginalny sposób, przedstawił analizę poziomu badań zespołów polskich na tle osiągnięć światowych, wykorzystując wskaźnik liczby cytowań według Science Citation Index.

W kolejnych wystąpieniach zawarto kompleksowe informacje dotyczące stanu badań nad biologią rozrodu poszczególnych gatunków zwierząt z uwzględnieniem efektów poznawczych i aplikacyjnych badań, uzyskanych w laboratoriach polskich

placówek naukowo-badawczych. Zwracano uwagę na konieczność poprawy wskaźników użytkowości rozrodczej zwierząt gospodarskich w Polsce, która jest ściśle sprzężona z kosztami produkcji żywności wysokiej jakości. Około 30–40% zwierząt hodowlanych przejawia zaburzenia w rozrodzie, konsekwencją czego jest brak potomstwa. Zagadnienie to staje się tym bardziej istotne, gdy dotyczy złego stanu warunków środowiskowych, w których przebywają zwierzęta, niskiej płodności oraz wysokiej zamieralności zarodków.

Dla przykładu, w przypadku bydła dotychczasowa selekcja zwierząt w kierunku wysokich wskaźników produkcyjności mlecznej powoduje, obok zakłóceń zdrowia zwierząt, określone zaburzenia procesów rozrodu przejawiające się wydłużaniem okresu międzywycieleniowego, zwiększoną liczbą zabiegów inseminacyjnych w celu uzyskania skutecznego zapłodnienia. Wynikają stąd główne kierunki badań polskich placówek naukowych dotyczące poznania mechanizmów selekcji i regulacji wzrostu pęcherzyka jajnikowego, regulacji czynności ciałka żółtego, wpływu czynników żywieniowych na czynności ciałka żółtego oraz macicy w cyklu i ciąży. Biorąc pod uwagę powiązania laktacji z procesami rozrodu prowadzone są również intensywne badania nad patologią gruczołu mlekowego i laktacją.

Nestorem polskich naukowców prowadzących badania nad rozrodem koni był profesor Władysław Bielański, który stworzył krakowski ośrodek naukowy o dużej renomie międzynarodowej. Główne problemy badawcze dotyczą zagadnień andrologicznych i biotechnologicznych użytkowania rozpłodowego ogiera oraz optymalnego wykorzystania funkcji rozrodczych klaczy. Stwierdzono, między innymi, użyteczność praktyczną niektórych wyznaczników biochemicznych plazmy nasienia do oceny jakości nasienia ogiera i jego przydatności do kriokonserwacji. Wskazano na znaczenie płynu pęcherzykowego klaczy jako źródła substancji, które są ważnymi wyznacznikami wzrostu pęcherzyków jajnikowych i jakości oocytów. Podjęto badania nad nowymi technikami wspomaganego rozrodu koni.

W ostatnich latach najbardziej dynamiczny rozwój badań podstawowych i stosowanych dotyczył rozrodu trzody chlewnej. Zgrupowane, głównie w ośrodku olsztyńskim, zespoły naukowo-badawcze przyczyniły się do nowych odkryć i rozwiązań dotyczących regulacji cyklu rujowego, mechanizmu matczynego rozpoznawania ciąży oraz hormonalnej regulacji komórek przysadki mózgowej i jajnika. Poważny wkład do biologii rozrodu zwierząt wnoszą również efekty badań polskich zespołów w zakresie andrologii molekularnej knura z uwzględnieniem kriobiochemicznych aspektów konserwacji nasienia tego gatunku zwierząt.

Badania nad rozrodem owiec są od wielu lat polską specjalnością naukową.

Wiele badań z zakresu biologii rozrodu ptaków wykonanych w polskich placówkach naukowych lub z udziałem polskich uczonych w placówkach zagranicznych przyczyniło się do postępu wiedzy drobiarskiej i przyniosło wymierne efekty gospodarcze. Dotyczy to zwłaszcza poznania endokrynnych uwarunkowań rozrodu kur typu nieśnego co pozwoliło na uzyskanie w wyniku selekcji linii kur znoszących

330–350 jaj w roku. Opanowano metody zapłodnienia pozaustrojowego oraz hodowli oocytów i zarodków ptaków. Za niezwykle perspektywiczne przedsięwzięcie należy uznać wykorzystanie jajowodu kury jako bioreaktora do produkcji ludzkich białek terapeutycznych.

Wysoka renoma międzynarodowa polskiej nauki w dziedzinie badań nad biologią rozrodu ryb związana jest z efektami naukowymi uzyskanymi w ośrodkach krakowskim, olsztyńskim i szczecińskim. Dotyczą one przede wszystkim neuroendokrynologii ryb oraz wykorzystania omawianych osiągnięć do opracowania biotechnologicznych metod sterowania rozrodem wielu cennych gatunków ryb.

Badania nad rozrodem zwierząt nieudomowionych, prowadzone głównie w Stacji Badawczej PAN w Popielnie, pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Jaczewskiego, ze względu na pionierski charakter, uzyskały wysokie uznanie w piśmiennictwie światowym.

Zwierzęta nieudomowione stanowią niezwykle interesujący model eksperymentalny w badaniach endokrynologicznych i andrologicznych dotyczących wpływu fotoperiodu na efektywność rozrodczą zwierząt. Opracowane metody i techniki biotechnologiczne mogą być wykorzystane, między innymi, do aktywnej ochrony niektórych ginących gatunków zwierząt wolnożyjących.

Zasygnalizowane w niniejszym opracowaniu wyniki badań nad biologią rozrodu zwierząt, uzyskane w polskich placówkach naukowo-badawczych dowodzą, że omawiana problematyka badawcza koresponduje z tendencjami zainteresowań światowych laboratoriów. Dokonana synteza służyć może programowaniu kierunków badawczych nad biologią rozrodu zwierząt w Polsce oraz tworzeniu nowych możliwości współpracy międzynarodowej. Z drugiej strony, upowszechnienie wygłoszonych w ramach programu Seminarium referatów na łamach czasopisma Postępy Nauk Rolniczych, stanowić może cenny materiał w procesie dydaktycznym szkół wyższych.

Jerzy Strzeżek
Przewodniczący Komitetu
Biologii Rozrodu Zwierząt PAN

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 7–28

Najważniejsze osiągnięcia biologii rozrodu ssaków ostatniego ćwierćwiecza na świecie

Adam J. Zięcik
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn,
e-mail: ziecik@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: biologia rozrodu, osiągnięcia, ssaki

Wstęp

Wytypowanie najważniejszych osiągnięć biologii rozrodu zwierząt ostatniego ćwierćwiecza nie jest łatwe. Biologia rozrodu jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dyscyplin biologii. Współczesne metody biologii molekularnej i biotechnologii prowadzą do coraz nowszych odkryć. Podejmując się zadania przygotowania referatu na sympozjum „Problemy poznawcze i aplikacyjne w rozrodzie zwierząt" zwróciłem się z prośbą do kilkudziesięciu znanych badaczy z całego świata o wytypowanie najważniejszych 2–3 osiągnięć w okresie ostatnich 25 lat. Otrzymałem 25 odpowiedzi, które przedstawiłem w tabeli 1. Ogółem wytypowano aż 22 zagadnienia. Wybór klonowania somatycznego nie budzi zdziwienia i na to osiągnięcie głosowało 64% respondentów. Sporym zaskoczeniem była druga pozycja – „Poznanie profili rozwoju pęcherzyków jajnikowych u zwierząt domowych i nowe osiągnięcia w synchronizacji owulacji u bydła". Zagadnienie to łączy ze sobą wyniki badań podstawowych nad regulacją cyklu płciowego i wynikające z nagromadzonej wiedzy rozwiązania praktyczne. Wysokie pozycje osiągnęły też wyniki badań regulacji funkcji ciałka żółtego i mechanizmu luteolizy, podobnie jak tzw. matczyne rozpoznanie ciąży (odpowiednio 3 i 4 pozycja na liście osiągnięć). Wśród pierwszych pięciu osiągnięć znalazł się też temat związany z możliwością różnicowania płci (seksowania) plemników i zarodków. Pięć wytypowanych zagadnień znajdujących się na czele przedstawionej listy pokrótce omówiono w następnej części artykułu.

Tabela 1. Najważniejsze osiągnięcia ostatnich 25 lat w rozrodzie ssaków użytkowych (wyniki ankiety zagranicznej)

Lp.	Wyszczególnienie	liczba głosów
1.	Klonowanie somatyczne (Dolly)✶✶	16
2.	Poznanie profili rozwoju pęcherzyków jajnikowych u zwierząt domowych i nowe osiągnięcia w synchronizacji owulacji u bydła✶	10
3.	Mechanizm luteolizy, kontrola funkcji ciałka żółtego✶✶✶✶	6
4.	Matczyne rozpoznanie ciąży✶✶✶	5
5.	Seksowanie (plemnik i zarodek)✶	5
6.	IVM, przenoszenie zarodków✶	4
7.	Zastosowanie ultradźwięków do badania ciąży i jajników✶	3
8.	Komórki macierzyste i ich omnipotencja✶	3
9.	Analiza genomu✶	3
10.	Transgeneza, transfekcja✶✶	2
11.	Regulacja rozrodu poprzez oś podwzgórzowo-przysadkową, charakterystyka generatora pulsów✶✶	2
12.	Witrifikacja i zamrażanie zarodków✶	2
13.	Postęp sztucznej inseminacji (inseminacja endoskopowa niskimi dawkami)✶✶	2
14.	Epigenetyka, wpływ żywienia matki na rozwój potomstwa✶	2
15.	Osiągnięcia biologii molekularnej✶	2
16.	Zależności pomiędzy wzrostem, żywieniem, produkcją a rozrodem✶	2
17.	Zastosowanie aglepristonu (antagonisty progesteronu) w rozrodzie małych zwierząt✶	2
	wczesny rozwój; reprogramowanie chromosomalne; zrozumienie cyklu komórkowego; zrozumienie systemu sygnałów komórki; odkrycie receptora estrogenowego β; znaczenie angiogenezy i angiolizy dla funkcji jajowodu, jajnika i macicy✶	1

Udział polskich zespołów: ✶ zauważalny; ✶✶ widoczny; ✶✶✶ znaczny; ✶✶✶✶ bardzo duży.

Najważniejsze osiągnięcia według rankingu zagranicznych respondentów

Klonowanie somatyczne

Klonowanie jest produkcją jednej lub wielu kopii osobników i występuje u zwierząt w sposób naturalny lub sztuczny, kiedy zarodek zostaje podzielony i powstają identyczne bliźnięta. Słowo klon (ang. clone) zostało użyte do opisania zwierząt wyprodukowanych poprzez transfer jądra komórki dla wytworzenia nielimitowanej liczby genetycznie identycznego potomstwa [73]. Pierwszy sukces w klonowaniu zwierząt gospodarskich miał miejsce w 1986 roku w Cambridge University, kiedy to Steen Malte Willadsen [112], poprzez fuzję komórki pobranej z 16-komórkowego zarodka owcy z oocytem pozbawionym jądra, uzyskał pierwszego sklonowanego i urodzonego ssaka. Następnie ten sam sposób klonowania (tzw. klonowanie zarodkowe) zastosowano z powodzeniem u bydła [79, 80].

Tabela 2. Kroki milowe w klonowaniu zwierząt z populacji komórek somatycznych (wg Campbella i in. [15])

Gatunek	Rok	Wiek dawcy	Typ komórki	Źródło
Owca	1995	zarodek	nabłonkowa	[16]
	1996	płód	fibroblast	[113]
	1996	dorosły	nabłonek gruczołu mlecznego	[113]
Krowa	1998	płód	fibroblast	[19]
	1998	dorosły	nabłonkowa jajowodu	[55]
Mysz	1998	dorosły	wzgórka jajonośnego	[109]
	1999	zarodek	zarodkowa komórka macierzysta	[110]
Koza	1999	płód	fibroblast	[4]
Świnia	2000	dorosły	wzgórka jajonośnego	[78]
Gaur	2000	dorosły	fibroblast	[67]
Muflon	2001	dorosły	granuloza	[66]
Kot	2002	dorosły	wzgórka jajonośnego	[87]
Królik	2002	dorosły	wzgórka jajonośnego	[18]
Banteng	2003	dorosły	fibroblast	[8]
Szczur	2003	płód	fibroblast	[116]
Muł	2003	płód	fibroblast	[114]
Koń	2003	dorosły	fibroblast	[33]
Jeleń	2003	dorosły	fibroblast	[26]

Te przełomowe osiągnięcia spowodowały bardzo umiarkowaną reakcję środowiska naukowego i publicznie zostały prawie niezauważone. Największy przełom w klonowaniu zwierząt nastąpił w 1996 roku, kiedy to Ian Wilmut i in. [113] wyprodukowali owcę Dolly, poprzez fuzję jądra komórki somatycznej hodowanej in vitro (fibroblast z tkanki gruczołu mlekowego) z enukleowanym oocytem. Możliwość przeniesienia jądra komórki somatycznej i jej rozwoju do dojrzałego osobnika (żywy dowód – Dolly) stała się najbardziej znanym współczesnym osiągnięciem biologii rozwoju. Sukces ten zmusił do poprawienia (czy też napisania od nowa) podręczników biologii reprodukcji, a także postawił świat wobec nowych naukowych i etycznych wyzwań. Klonowanie somatyczne zostało następnie pomyślnie zastosowane w rozrodzie wszystkich zwierząt gospodarskich, psów i kotów oraz zwierząt laboratoryjnych, jakkolwiek z różnym powodzeniem. Dokonano również międzygatunkowego klonowania somatycznego i uzyskano osobniki prymitywnej rasy bydła – gaura, bantenga oraz muflona i jelenia wirgińskiego. Milowe kroki w postępie klonowania somatycznego ssaków przedstawiono w tabeli 2 [15]. Do tej pory udało się sklonować setki żywo urodzonych cieląt i myszy, dziesiątki owiec, kóz i świń oraz pojedyncze osobniki konia, psa i kota. Są to jednak genetyczne kopie genomu zawartego w jądrze komórkowym osobnika-dawcy, a nie jego wierne repliki, gdyż mają m.in. mitochondrialny DNA oocytu dawczyni. W USA uzyskano jałówki (z fibroblastów skóry) bydła Charolais, a we Francji rasy Holstein. Spektakularnym

osiągnięciem było sklonowanie w Kanadzie jednego z najlepszych na świecie buhajów (Hanoverhill Starbuck) i to w dwa lata po jego śmierci. W USA sklonowano buhaje Blach Angus z genetycznie uwarunkowaną odpornością na brucelozę. Standardowa procedura transferu jądra komórki somatycznej składa się z 3 etapów: enukleacji oocytu, wprowadzenia w to miejsce komórki (lub jądra) dawcy i aktywacji zrekonstruowanego zarodka. Komórki somatyczne dawcy otrzymuje się obecnie od zwierząt w różnym wieku (płody, noworodki, młode i starsze osobniki), a nawet krótko po śmierci. Otrzymane do tej pory potomstwo wywodzi się z około 200 tkanek dorosłych ssaków. Wydaje się, że niektóre tkanki, a szczególnie obecne w układzie rozrodczym (komórki ziarniste pęcherzyka czy nabłonka jajowodu oraz fibroblasty), są bardziej predysponowane do przenoszenia jąder niż inne. W Polsce prace nad klonowaniem zarodkowym i somatycznym ssaków prowadzone są od końca lat osiemdziesiątych [93]. Opracowano m.in. oryginalną metodę bisekcji blastocyst bydlęcych [94] oraz uzyskano pierwsze na świecie blastocysty kota domowego z wykorzystaniem dojrzałych in vitro oocytów rekonstruowanych z jąder komórek wzgórka jajonośnego i fibroblastów płodowych. Dużym osiągnięciem ośrodka krakowskiego, kierowanego przez prof. Smorąga, jest opracowanie nowej metody chimerowego klonowania somatycznego królika z wykorzystaniem pojedynczych enukleowanych blastomerów jako biorców egzogennych jąder komórkowych i uzyskanie nie tylko chimerowej blastocysty, a także urodzonego potomstwa transgenicznego z transgenem Tg (Wep-GM1). Urodzone króliki były również pierwszymi ssakami uzyskanymi tą metodą klonowania somatycznego [95]. Należy podkreślić, że podstawy klonowania zarodkowego metodą izolacji blastomerów oraz klonowania chimerowego zostały po raz pierwszy opracowane już na przełomie lat 60/70 ubiegłego wieku przez Tarkowskiego i in. [104, 105]. Obecnie Modliński i in. [72] wykorzystują enukleowane zygoty jako komórki-biorcy w procedurze klonowania.

Z naukowego punktu widzenia wyprodukowanie „Dolly" i następne udane klonowanie zwierząt gospodarskich jest niewątpliwie największym osiągnięciem w rozrodzie zwierząt w ciągu ostatniego ćwierćwiecza. Jednakże do tej pory ten sukces ma bardzo mały lub niewidoczny wpływ na produkcję zwierząt. Jedną z wielu przyczyn jest bardzo mała wydajność dotychczas stosowanych procedur, jak również problemy zdrowotne klonowanych zwierząt. Niestety, urodzone sklonowane osobniki obarczone są wieloma wadami rozwojowymi, a ok. 50% cieląt umiera w ciągu 3 dni po urodzeniu. Opisano istnienie tzw. „zespołu klonowania" związanego z różnorodnymi zaburzeniami w przeprogramowywaniu genomu jąder somatycznych, co prowadzi do powstania określonego rodzaju anomalii rozwojowych. Termin „large offspring syndrome" używany jest obecnie do opisania licznych zaburzeń i chorób, przy czym duża masa płodu jest tylko jednym z wielu objawów. Pocieszające jednak jest stwierdzenie, że potomstwo (pierwsza i druga generacja) sklonowanych zwierząt jest zwykle zdrowe, nawet jeżeli pochodzi od dwóch sklonowanych rodziców. Wygląda na to, że w życiu klonów, tak jak w życiu społeczeństw, pierwsze pokolenia muszą być

poświęcone dla korzystnego rozwoju następnych. Pomyślne jest również spostrzeżenie, że użytkowość rozrodcza klonowanych samic nie różni się od kontroli i ich potomstwo jest żywe i normalne [50]. Prosięta uzyskane od klonowanych knurów i loch są normalne i zdrowe i nie różnią się liczbą w miocie, masą przy urodzeniu, śmiertelnością perinatalną i przy odsadzeniu.

Poznanie profili rozwoju pęcherzyków jajnikowych u zwierząt domowych i nowe osiągnięcia w synchronizacji owulacji u bydła

Antralne pęcherzyki w jajnikach zwierząt zostały po raz pierwszy opisane przez holenderskiego anatoma Regniera de Graafa w 1672 r. W tłumaczeniu jego pracy znajdujemy wzmiankę o tym, że wielkość pęcherzyków zależy od gatunku zwierząt. U owcy i świni osiągają one „wielkość gradu", a u krowy mogą być „większe od czereśni" [54]. Od czasów de Graafa nie przypisywano dużej roli pęcherzykom jajnikowym w organizacji cyklu rujowego. Dopiero w 1922 roku Frank [32] stwierdził, że cykle powodowane są działaniem jajnika na macicę, a rozwój, wzrost oraz owulacja pęcherzyka jajnikowego jest wydarzeniem najważniejszym – centralnym. Brown [13] stwierdził, że liczne pęcherzyki są zawsze obecne w cyklu rujowym u bydła, ale pęcherzyk przeznaczony do owulacji zaczyna powiększać się w połowie cyklu, a jego bardzo szybki wzrost następuje po wystąpieniu rui. Pierwszym, który zaobserwował, że wzrost pęcherzyków odbywa się falami był Rajakoski [83]. Obserwacje te pozostawały kontrowersyjne aż do lat osiemdziesiątych, kiedy Pierson i Ginther [75], stosując ultrasonografię jako narzędzie nieinwazyjnego monitorowania jajnika, prześledzili wzrost i regresję poszczególnych pęcherzyków jajnika u tego samego zwierzęcia i udowodnili, że pęcherzyki antralne u bydła rosną grupowo w sposób przypominający fale [76, 85, 88]. To odkrycie zostało następnie potwierdzone dla innych okresów aktywności rozrodczej bydła i innych gatunków. Obecnie fala pęcherzykowa jest charakteryzowana przez zsynchronizowany wzrost grupy pęcherzyków, z których jeden (lub więcej) w sposób specyficzny gatunkowo, kontynuuje wzrost, podczas gdy inne ulegają atrezji w różnych okresach [28].

Powstało szereg nowych terminów stosowanych przy opisie fal pęcherzyków na podstawie obserwacji ultrasonograficznych. Tak np. dzień pojawienia się fali lub rekrutacji pęcherzyków jest pierwszym dniem fali, wtedy kiedy rosnąca grupa pęcherzyków jest wykrywalna przy użyciu ultrasonografii. Chociaż pojawienie się fali (ang. emergence) jest często nazywane synonimowo również rekrutacją (ang. recruitment), to ostatnie określenie jest bardziej precyzyjnie definiowane jako wzrost pęcherzyka zależny od gonadotropin [25]. Zwykle wzrost taki następuje, kiedy pęcherzyki osiągają średnicę 4–6 mm u bydła i 2–4 mm u owcy. Selekcja pęcherzyków jest procesem, w którym następuje redukcja liczby rosnących pęcherzyków w danej fali do ilości pęcherzyków ulegających owulacji u danego gatunku. W każdej pojawiającej się fali część pęcherzyków ulega tzw. dewiacji i wcześniej podlega atrezji nie osiągając rozmiarów pęcherzyka dominującego. U bydła – gatunku, którego falowy profil wzrostu pęcherzyków jest bardzo dobrze scharakteryzowany –

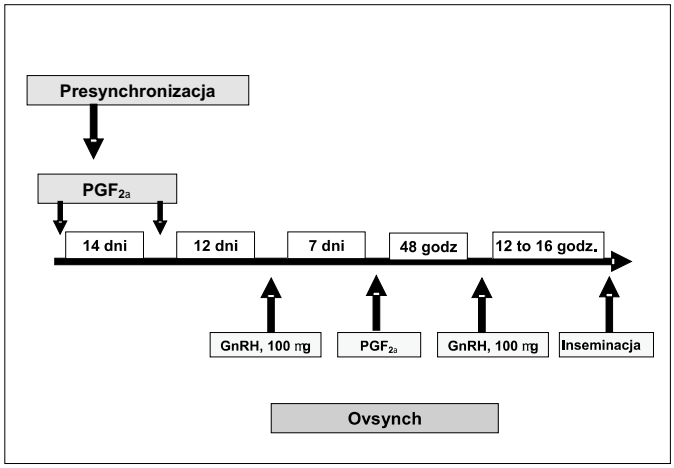
Tabela 3. Liczba fal pęcherzykowych i średnica pęcherzyków w cyklu rujowym niektórych gatunków zwierząt (wg. Evansa [27])

Gatunek	Maksymalna średnica pęcherzyków			Piśmiennictwo
	liczba fal pęcherzykowych w cyklu	nieowulujace [mm]	owulujące [mm]	
Bydło	2 lub 3	10–15	12–20	[31, 38]
Owce	2–4	5–7	6–7	[6, 29, 40]
Kozy	3 lub 4	5–9	6–9	[24, 39, 41]
Konie	1 lub 2	30–45	40–55	[37]
Świnie	0	6–7	7–10	[22, 23]
Bawoły	2 lub 3	10–16	13–18	[7, 68, 103]
Psy	?	1–2	7–11	[49]
Koty	1 każdego 8–24 dnia	?	3–4	[86]
Lamy	1 każdego 11–20 dnia	9–16	9–12	[1, 17]
Wielbłady	1 każdego 17–19 dnia	17–64	9–19	[92]
Kury	0	6–8	powyżej 40	[35]
Czlowiek	2 lub 3	?	23	[3]

w większości cykli rujowych występują 2 lub 3 fale. Charakterystykę fali pęcherzyków u bydła i innych gatunków zwierząt udomowionych przedstawiono w tabeli 3 [27].

Najnowsze badania zespołu Mihm [70] dostarczyły dowodów, że dominujący pęcherzyk „pozbywa się" zależności od FSH, ale staje się zależny od LH w czasie niskiego poziomu FSH w przebiegu fali pęcherzykowej. Dzięki badaniom grup Fortune [30], Irelanda [53] i Mihm [71] określono różnice pomiędzy pęcherzykami dominującymi a podporządkowanymi. W czasie spodziewanej dewiacji pęcherzyk dominujący ma wyższą wartość estradiolu w płynie pęcherzykowym oraz wolnego IGF-I. Zawartość tego czynnika wzrostu jest kontrolowana przez zachowanie równowagi zawartości białek wiążących (IGFBP-4 i IGFBP-5) i proteaz, jak PAPR-A (Pregnancy-Associated Plasma Protein-A). Białka wiążące IGF zapobiegają przyłączaniu się IGF-I do swojego receptora.

Współczesna wiedza dotycząca czynników, centralnych i lokalnych, kontrolujących dynamikę wzrostu pęcherzyków i funkcję ciałka żółtego, pozwoliła na opracowanie u bydła specjalnych systemów manipulowania jajnikiem na potrzeby inseminacji w wyznaczonym czasie. Proponowane procedury regulacji owulacji u bydła polegają na zastosowaniu farmaceutyków porównywalnych z hormonami lub ich analogami kontrolującymi funkcję jajnika u krowy. Naśladują one naturalne fizjologiczne procesy. We wczesnych latach siedemdziesiątych zastosowano PGF2α do indukcji regresji ciałka żółtego. Ówczesne strategie polegały na dwóch iniekcjach PGF2α co 11 dni (jałówki) lub 14 dni (krowy w laktacji), zakładając, że druga iniekcja prostaglandyny spowoduje wyższy poziom synchronizacji zwierząt w rui. Jednakże ten sposób nie był wystarczająco precyzyjny do przeprowadzenia inseminacji w określonym czasie bez wykrywania rui. Właśnie dzięki znajomości dynamiki rozwoju pęcherzyków podczas cyklu rujowego stało się jasne, że synchronizacja pęcherzyków powinna być powiązana z indukowaną regresją ciałka żółtego w celu lepszej kontroli



Rysunek 1. Protokół programu inseminacyjnego OvSynch dla wykonania sztucznej inseminacji w określonym czasie u krów po porodzie z zastosowaniem presynchronizacji [106]

czasu wystąpienia rui. Wiadomo, że sprowokowany przez podanie GnRH, wyrzut LH powoduje owulację i luteinizację dominującego pęcherzyka o średnicy około 10 mm. Z drugiej strony luteinizacja dominującego pęcherzyka prowadzi do rekrutacji nowej fali pęcherzykowej, tak że nowy pęcherzyk dominujący pojawia się 7 dni później, kiedy już można spowodować regresję oryginalnego lub indukowanego przez GnRH ciałka żółtego (CL) i poprawić precyzję momentu wystąpienia rui. Tak zaprogramowana sekwencja podawania hormonów jest podstawą programu inseminacyjnego zwanego OvSynch (rys. 1). Protokół ten polega na iniekcji GnRH w dowolnym okresie cyklu rujowego, w celu wywołania owulacji pęcherzyka dominującego i synchronizacji pojawienia się nowej fali. Siedem dni później podaje się PGF2α w celu regresji oryginalnego CL i nowo powstałego (po iniekcji GnRH). Następnie podaje się ponownie GnRH po 48 godz. wywołując zsynchronizowaną owulację 24–32 godz. później. Program ten rozbudowany został współcześnie dodatkowymi programami: desynchronizacją (ReSynch), posynchronizacją i reinseminacją.

Mechanizm luteolizy, kontrola funkcji ciałka żółtego i matczyne rozpoznanie ciąży

Prace nad funkcją ciałka żółtego u krowy i owcy zapoczątkował William Hansel, odkrywając już w 1964 roku, że LH jest głównym hormonem luteotropowym [47]. Niezwykła żywotność naukowa tego badacza pozwoliła mu prawie pól wieku później, określić rolę tlenku azotu (NO) i endoteliny w regresji ciałka żółtego. Do roku 1980 generalnie już akceptowano, że: 1) LH jest główną (i przypuszczalnie jedyną) luteotropiną przysadkową [47, 51]; 2) macica jest miejscem powstania luteolizyny

i przekazuje sygnał do ciałka żółtego poprzez lokalny mechanizm [2, 14, 36]; 3) $PGF_{2\alpha}$ pochodzenia macicznego osiąga przyległy, posiadający CL jajnik poprzez mechanizm żylno-tętniczego transferu powodując lutealną regresję [36, 48]. W latach osiemdziesiątych utrwalił się również pogląd, że u przeżuwaczy indukowane przez oksytocynę luteolityczne pulsy $PGF_{2\alpha}$ powodują funkcjonalną i strukturalną regresję CL w procesie zwanym luteolizą.

W dominujących do dziś koncepcjach luteolizy CL proces ten rozpoczynający się w luminalnym i gruczołowym nabłonku endometrium wymaga następujących po sobie działań progesteronu, estrogenów i oksytocyny. Ciągła ekspozycja endometrium na progesteron podczas fazy lutealnej powoduje regulację w dół receptorów progesteronu (około 11 dnia cyklu), co przerywa hamujący wpływ progesteronu na ekspresję receptora estradiolowego α (ERα) i receptora oksytocyny (OTR). ERα pojawia się ponownie 11–12 dnia post-estrus, tuż przed wystąpieniem receptorów oksytocyny (OTR) w dniach 13 i 14 cyklu. Oksytocyna (OT) wiąże się z OTR w nabłonku endometrium i zwiększa uwalnianie luteolitycznych pulsów $PGF_{2\alpha}$ poprzez ścieżkę cyklooksygenazy-2 (COX-2), powodując regresję CL. U ciężarnej owcy interferon tau (IFNτ), który jest syntetyzowany i wydzielany przez wydłużający się zarodek, począwszy od 10 dnia ciąży wiąże się do swojego receptora w nabłonku luminalnym endometrium i hamuje transkrypcję genu ERα. To działanie IFNτ zapobiega formowaniu OTR, powodując podtrzymanie funkcji CL i produkcję progesteronu. Interesujące jest, że IFNτ nie hamuje ogólnej produkcji $PGF_{2\alpha}$, która nawet jest większa u ciężarnych owiec niż cyklicznych oraz nie wpływa na ekspresję COX-2 w nabłonku endometrium wczesnociężarnych owiec [96]. W badaniach mechanizmów kontroli funkcji ciałka żółtego, luteolizy i matczynego rozpoznania ciąży bardzo mocno zaangażowane są polskie zespoły badawcze od końca lat siedemdziesiątych XX wieku. Kilka lat wcześniej doniosłe badania nad funkcją $PGF_{2\alpha}$ u owcy i krowy prowadził Bernard Barcikowski [5, 69]. Zainspirowane przez Krzymowskiego [62] prace nad luteolizą i funkcją ciałka żółtego u świni [56, 118] zaowocowały szeregiem odkryć i nowych koncepcji regulacji jajnika u świni i krowy.

Badania Krzymowskiego i Stefańczyk-Krzymowskiej doprowadziły do odkrycia i udokumentowania nieznanych wcześniej mechanizmów działania lokalnego systemu zwrotnego i docelowego transferu hormonów jajnikowych w obszarze okołojajnikowego kompleksu naczyniowego, a szczególnie zwrotnego transferu prostaglandyn w obszarze naczyń krwionośnych i limfatycznych krezki macicy, zapewniającego regulacje ukrwienia macicy [63, 65, 97, 98, 99]. Opracowano również i opublikowano oryginalną, własną teorię wyjaśniającą mechanizmy przebiegu regulacji cyklu rujowego u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu ukrwienia endometrium i powstającej hipoksji w macicy na przebieg regulacji cyklu rujowego [61].

W nurt badań nad funkcją ciałka żółtego u bydła włączył się mocno zespół prof. Jana Kotwicy. Wykazał on bowiem znaczenie lokalnej stymulacji β-adrenergicznej jako czynnika wspierającego czynność ciałka żółtego [57]. Wpływ ten odbywa się

poprzez oddziaływanie na aktywność enzymów oraz ekspresję genów dla białka STAR i enzymów steroidogenezy [84]. Ważną publikacją było zakwestionowanie roli oksytocyny jako czynnika inicjującego luteolizę w czasie cyklu jajnikowego u krowy [59]. Pogląd ten, podtrzymywany zresztą przez innych badaczy, zbieżny jest z hipotezą, że w luteolizę CL u wielu gatunków zwierząt zaangażowany jest „plejotropowy kompleks" wielu czynników, jak oksytocyna, LH czy TNFα [117], które niezależnie od siebie, mogą zwiększać syntezę i uwalnianie $PGF_{2\alpha}$.

Kotwica i in. [58] wykazali również stymulujący wpływ progesteronu na swoją własną syntezę w CL u bydła. Tzw. autoregulacja syntezy progesteronu, czyli stymulujący wpływ tego hormonu na aktywność enzymów oraz na wzrost mRNA dla enzymów steroidogenezy w CL i na nasilenie procesów antyapoptycznych [84] obowiązuje prawdopodobnie w CL innych gatunków zwierząt.

Skarżyński i in. wykazali m.in., że jednym z głównych czynników zaangażowanych w regulację luteolizy u krowy jest cytokina TNFα, która uwalnia $PGF_{2\alpha}$ z macicy oraz bezpośrednio działa na CL, powodując jego regresję [89, 91]. IFNτ natomiast hamuje stymulowane przez TNFα wydzielanie $PGF_{2\alpha}$ w procesie matczynego rozpoznania ciąży [74]. Rolę uniwersalnego mediatora $PGF_{2\alpha}$ i TNFα w ich działaniu na CL krowy podczas luteolizy pełni NO [89, 90], syntetyzowany lokalnie w CL krowy, stymulując uwalnianie prostaglandyn i hamując syntezę progesteronu [91]. Najistotniejszym odkryciem zespołu Skarżyńskiego jest wykazanie po raz pierwszy, że zahamowanie lokalnej syntezy NO w narządzie rodnym krowy, powstrzymuje indukowaną przez $PGF_{2\alpha}$ luteolizę [91]. TNFα i NO są więc głównymi auto/parakrynnymi regulatorami oddziaływania $PGF_{2\alpha}$ w procesie kontroli funkcji CL.

Regulacja funkcji CL jest bardzo złożona i, oprócz wymienionych wyżej czynników, wpływa na nią LH i prolaktyna [42, 43, 118] oraz hormony metaboliczne jak TSH [46] czy GH, IGF-1 i leptyna [45, 81, 82].

U świni wydłużający się zarodek syntetyzuje i wydziela estradiol, który jest głównym czynnikiem utrzymującym funkcje CL [34]. Podobnie jak u przeżuwaczy, luteolizyną u świni jest $PGF_{2\alpha}$, choć podawanie jej in vivo obniża zawartość progesteronu we krwi od 12 dnia cyklu rujowego i rozpoczyna regresję tkanki lutealnej [62]. Krzymowski i in. [64] i Stefańczyk-Krzymowska i in. [98] sugerują, że mechanizm ochronny ciałek żółtych oparty jest na wychwycie $PGF_{2\alpha}$ w obrębie więzadła szerokiego macicy, a $PGF_{2\alpha}$ transportowana jest następnie do macicy z krwi tętniczej na zasadzie przenoszenia zwrotnego. Luteotropowo/antyluteolityczne działaie PGE_2 jest powszechnie znane.

Zawartość mRNA i białka COX-2, kluczowego enzymu pierwszego etapu syntezy prostaglandyn, znacznie podnosi się w błonie śluzowej macicy podczas luteolizy u loszek, a u ciężarnych zwierząt ten wzrost utrzymuje się również w czasie implantacji [9]. Ekspresja transkryptów końcowych enzymów szlaku syntezy prostaglandyn $F_{2\alpha}$ (PGFS) i E_2 (PGES-1), których wykazanie było możliwe dzięki sklonowaniu ich

cDNA [107], potwierdziły potencjalną rolę PGFS w regulacji luteolizy u świni. Stwierdzono również wysoką ekspresję mPGES-1 w endometrium przed implantacją.

Ostatnio wykazano, że już 11–12-dniowe zarodki świni mają kompletny system enzymatyczny na poziomie genu i białka właśnie do syntezy prostaglandyny E_2 [108]. W tym czasie zarodki nie mają zdolności syntezy $PGF_{2\alpha}$, która to pojawia się w 14 dniu. Dodatkowo estradiol hamuje enzymy zaangażowane w syntezę $PGF_{2\alpha}$, a szczególnie 9-ketoreduktazę. Razem powoduje to wzrost podaży PGE_2, co zwiększa stosunek PGE_2 : $PGF_{2\alpha}$, newralgiczny dla podtrzymania funkcji ciałka żółtego, co wykazały m.in. Gregoraszczuk i Michaś [44].

Różnicowanie płci (seksowanie)

Różnicowanie płci potomstwa, z możliwością wyprodukowania większej ilości jałówek do remontu stada, byłoby bardzo przydatne dla hodowców bydła mlecznego. Do niedawna jedyną opcją było seksowanie zarodków. Pojedyncza komórka może być potencjalnie przebadana nie tylko na obecność chromosomów X i Y, ale również na ekspresję nieograniczonej ilości genów lub zmian chromosomalnych.

W 1987 roku Larry Johnson z USDA (USA) wprowadził metodę sortowania nasienia opartą na zawartości DNA. Przy użyciu barwnika fluoroscencyjnego (Hoecht 33342) wiążącego się z kwasami nukleinowymi, nasienie zostało oznakowane i sortowane w specjalnym fluoroscencyjnym sorterze komórkowym (FACS). Plemniki z chromosomem X zawierają więcej DNA, a tym samym więcej barwnika, i mogą być oddzielone od plemników Y. Technologia ta jest obecnie komercyjnie dostępna w USA. Występują jednak duże niedogodności związane z technologią seksowania nasienia. Po pierwsze jest to proces bardzo powolny, o wydajności około 150 do 200 słomek nasienia/urządzenie w ciągu dnia. Dla porównania, mleczne farmy USA używają prawie 44000 porcji nasienia każdego dnia. Dodatkowo, wiele plemników ulega uszkodzeniu w procesie sortowania i aż 70% nie może być przesortowana z powodu uszkodzeń lub też braku „wyznakowania". Drugim problemem jest niski procent zapłodnienia (35% vs 55% dla „nieseksowanego" nasienia) chociaż uzyskuje się 95% planowanej płci. W Polsce, na początku lat dziewięćdziesiątych XX wieku, w Instytucie Zootechniki, rozpoczęto prace nad metodami regulacji płci u zwierząt domowych [111] stwierdzając, szybszy rozwój in vitro zarodków bydlęcych płci męskiej. W 2003 roku uzyskano pierwsze cielę urodzone po inseminacji nasieniem seksowanym [11]. Stwierdzono również silny wpływ nawet niewielkich uszkodzeń chromatyny plemnikowej na obniżenie płodności buhajów [12], ale nie ogierów[10] po procedurze różnicowania płci.

Rozmieszczenie zespołów biologii rozrodu w Polsce i próba analizy poziomu badań na tle osiągnięć światowych

Obecnie w Polsce istnieje ponad 50 zespołów naukowych prowadzących badania w zakresie szeroko rozumianej biologii rozrodu ssaków, ptaków i ryb, skupionych w głównie 10 ośrodkach (środowiskach) reprezentujących uczelnie akademickie, przede wszystkim akademie rolnicze, instytuty PAN i resortowe (rys. 2). Dwa najsilniejsze i najliczniejsze to środowisko olsztyńskie (UW-M i IRZBZ PAN) i krakowskie (AR, UJ i IZ). Na trzecim miejscu, ale w sporym dystansie od Olsztyna i Krakowa, plasuje się środowisko warszawskie (instytuty PAN w Jabłonnie i Jastrzębcu oraz SGGW) z ośmioma zespołami. W pozostałych ośrodkach pracują po 2–3 zespoły. Na podkreślenie zasługuje pojawienie się nowych grup w Rzeszowie i Siedlcach. Należałoby postawić pytanie, jaki jest udział badań prowadzonych w Polsce w nauce światowej w zakresie biologii rozrodu zwierząt. Hryniewicz [52] podaje cztery kryteria wkładu danej dyscypliny do nauki światowej. Są to:

Rysunek 2. Liczba zespołów naukowych biologii rozrodu zwierząt w 10 ośrodkach w Polsce

- liczba prac publikowanych w czasopismach o międzynarodowym zasięgu i liczba cytowań tych prac w literaturze naukowej;
- liczba wygłaszanych referatów plenarnych na konferencjach międzynarodowych;
- organizacja w Polsce międzynarodowych konferencji z danej dyscypliny naukowej;
- udział w międzynarodowych programach badawczych.

Uważa się również, że „liczba cytowań to podstawowy wskaźnik jakości publikacji naukowych, bo tylko nowatorskie prace są przywoływane wielokrotnie" [60]. Przyjmując liczbę cytowań jako uproszczony wskaźnik „wkładu" biologii rozrodu zwierząt w Polsce do nauki światowej, w tabeli 1 zaznaczono gwiazdkami (od 1 do 4) udział polskich zespołów. Udział ten jest zauważalny w większości wytypowanych przez zagranicznych ekspertów zagadnień, jakkolwiek najwięcej cytowań polskich naukowców dotyczy mechanizmu luteolizy i kontroli funkcji ciałka żółtego oraz problemu matczynego rozpoznania ciąży. Badania nad klonowaniem zarodkowym i somatycznym wykonywane w Polsce są również mocno reprezentowane w piśmiennictwie światowym. W tabeli 4 przedstawiono ilość cytowań polskich liderów zespołów zaangażowanych w badania biologii rozrodu ssaków z zaznaczeniem środowiska naukowego, liczby cytowań (wyrażonej w przedziałach) i reprezentowanej specjalności. Największą liczbą cytowań w tej grupie osób wg SCI szczyci się prof. Barbara Bilińska z UJ (przedział 500–600 w ciągu ostatnich 10 lat), reprezentująca andrologię. Biorąc pod uwagę tylko rozród ssaków w czołowej dwunastce najczęściej cytowanych autorów – 8 reprezentuje endokrynologię rozrodu, 2 – andrologię i 2 – biotechnologię, przy czym reprezentowane są tylko środowiska krakowskie i olszyńskie w 50 procentach. Poszerzając liczbę cytowań liderów grup o osoby

Tabela 4. Liczba cytowań polskich liderów zespołów biologii rozrodu ssaków w okresie 1996–2006 z uwzględnieniem środowiska naukowego i specjalności naukowej (wg Institute for Scientific Information – Science Citation Index)

Lp.	Środowisko naukowe	Liczba cytowań					Specjalność naukowa
		50–100	100–200	200–400	400–500	500–600	
1.	Kraków					x	andrologia
2.	Olsztyn				x		endokrynologia
3.	Olsztyn				x		endokrynologia
4.	Olsztyn			x			endokrynologia
5.	Kraków			x			endokrynologia
6.	Olsztyn			x			endokrynologia
7.	Kraków			x			biotechnologia
8.	Olsztyn		x				andrologia
9.	Olsztyn		x				endokrynologia
10.	Kraków		x				endokrynologia
11.	Kraków		x				biotechnologia
12.	Kraków		x				endokrynologia

Tabela 5. Liczba cytowań polskich liderów zespołów biologii rozrodu kręgowców (ssaki, ptaki ryby) w okresie 1996-2006 z uwzględnieniem środowiska naukowego i specjalności naukowej (wg Institute for Scientific Information – Science Citation Index)

Lp.	Środowisko naukowe	Liczba cytowań					Specjalność naukowa
		50–100	100–200	200–400	400–500	500–600	
1	Olsztyn					x	andrologia
2	Kraków					x	andrologia
3	Olsztyn				x		endokrynologia
4	Olsztyn				x		endokrynologia
5	Olsztyn			x			endokrynologia
6	Kraków			x			endokrynologia
7	Olsztyn			x			endokrynologia
8	Olsztyn			x			andrologia
9	Kraków			x			biotechnologia
10	Olsztyn		x				andrologia
11	Olsztyn		x				endokrynologia
12	Kraków		x				endokrynologia
13	Kraków		x				biotechnologia
14	Kraków		x				endokrynologia
15	Warszawa		x				biotechnologia
16	Kraków		x				biotechnologia
17	Warszawa		x				neuroendokrynologia
18	Warszawa		x				neuroendokrynologia
19	Olsztyn		x				endokrynologia
20	Olsztyn		x				patologia rozrodu
21	Olsztyn		x				endokrynologia
22	Bydgoszcz		x				rozród ptaków
23	Olsztyn	x					endokrynologia
24	Poznań	x					biotechnologia

zajmujące się rozrodem ptaków i ryb oraz wydłużając ją do 24 pozycji, otrzymujemy pełniejszy przegląd wkładu polskich naukowców do nauki światowej (tab. 5). W tym ustawieniu pałeczkę lidera przejmuje prof. Andrzej Ciereszko z IRBZ PAN w Olsztynie – androlog ryb, nieznacznie wyprzedzając prof. Bilińską. W dalszym ciągu przoduje endokrynologia rozrodu (11 osób), przed biotechnologią i andrologią (odpowiednio 5 i 4 osoby). Na tej rozszerzonej liście znajduje się również neuroendokrynologia (2 osoby) oraz patologia rozrodu i rozród ptaków (po 1 osobie).

Geograficznie, na pierwszym miejscu jest Olsztyn (50%) przed Krakowem (29,1%) i środowiskiem warszawskim (12,5%). W tabeli 5 pojawili się też przedstawiciele Bydgoszczy i Poznania.

Biologia rozrodu samca

Analiza oceny polskiego wkładu biologii rozrodu do dorobku ogólnoświatowego na podstawie cytowań, wyraźnie wskazuje, że opracowana lista najważniejszych osiągnięć tylko na podstawie zagranicznej ankiety nie zwiera andrologii rozrodu. Przyczyną tego może być fakt, że wśród zagranicznych ankietowanych nie było andrologów. Andrologia w Polsce ma długą tradycję, a polscy prekursorzy w piśmiennictwie światowym to: Wierzbowski S., Wierzchoś E. 1969. Cannulation of the vas defferens in the boar. *J. Reprod. Fertil*. 19: 173–175 oraz Strzeżek J., Wołos A. 1974. Some biochemical and immunological properties of a 5'-nucleotidase of bull seminal plasma. *J. Reprod. Fertil*. 40: 197–201.

Następne lata przyniosły niepodważalny rozwój badań nad biologią rozrodu samca, z uwzględnieniem zagadnień technologicznych nasienia (konserwacja i kriokonserwacja, rozdział plemników X i Y) w różnych ośrodkach naukowych kraju. Pionierem badań biochemii męskiego układu rozrodczego zwierząt gospodarskich w Polsce jest prof. Jerzy Strzeżek. Zainteresowania zespołu prof. Strzeżka dotyczą trzech głównych problemów badawczych, rozwiązywanych przede wszystkim na modelu knura:

1. Czynniki wpływające na produkcję i jakość nasienia.
2. Proteomika plazmy nasienia.
3. Kriobiologia nasienia (kriobiochemia).

Wizytówką naukową zespołu w ciągu ostatnich dziesięcioleci są badania nad białkami plazmowymi różnych gatunków zwierząt. Badania te mieszczą się w nowym kierunku badawczym – proteomice, zajmującym się porównywaniem proteomów – zespołów białek kodowanych przez genom z uwzględnieniem ich struktury, lokalizacji, modyfikacji, interakcji, aktywności i funkcji. Spośród licznych substancji białkowych i peptydowych izolowanych i oczyszczonych przez zespól [101, 102, 115] wyróżnić należy badania nad kompleksem glikoproteinowym o m.cz. 54 kDa (Gp 54), izolowanym z płynu gruczołów pęcherzykowych knura [100]. Obok unikalnych właściwości biologicznych (m.in. immunosuppresorowe, antyproteolityczne, hemoglutacyjne) analiza sekwencji aminokwasów wykazała homologię Gp 54 z sekwencjami plazmowych białek adhezyjnych (spermadhezyny AQN-3 AWN i DQH) [77].

Lider rankingu prac z zakresu rozrodu ssaków – prof. B. Bilińska za znaczące osiągnięcia w swoim dorobku naukowym, ujmując chronologicznie, uważa:

1. Wykazanie korelacji pomiędzy morfologią, a funkcją in vitro komórek Leydiga gryzoni (udział cytoszkieletu w procesie steroidogenezy).
2. Wykazanie parakrynowych oddziaływań pomiędzy komórkami Leydiga, Sertoliego, produktami kanalika nasiennego oraz makrofagami tkanki interstycjalnej.
3. Określenie aktywności, ekspresji i miejsca działania aromatazy u samców szczura, nornicy rudej, konia i człowieka.

Najczęściej cytowane jej prace to:

1. Levallet J., Bilińska B., Mittre H., Genissel C., Fresnel J., Carreau S. 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 58: 919–926 (indeks cytacji = 117).
2. Carreau S., Genissel C., Bilińska B., Levallet J. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int. J .Androl.* 22: 211–223 (indeks cytacji = 91).
3. Bilińska B., Leśniak M., Schmalz B.. 1997. Are ovine Leydig cells able to aromatize androgens? *Reprod. Fertil. Develop.* 9: 193–199 (indeks cytacji = 36).

Uwagi końcowe

Podsumowując światowe osiągnięcia można stwierdzić, że za najważniejsze uznano te dotyczące biotechnologii i biotechniki rozrodu, a także badania wyjaśniające regulacje funkcji gonad. Biologia rozrodu zwierząt w Polsce jest widoczna na tle osiągnięć światowych i należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się dyscyplin naukowych w kraju.

Przedstawione powyżej obserwacje były próbą obiektywnego spojrzenia na najważniejsze osiągnięcia w rozrodzie ssaków ostatniego ćwierćwiecza. Jednak, według prof. Krzymowskiego, Polska ma swoją specyfikę, ze względów zrozumiałych trudno zauważalną w świecie. Wynika ona z kompetencji naukowej grupy badaczy-fizjologów, która zainicjowała i rozwinęła do znaczących rozmiarów badania naukowe w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych oraz wykształciła kadrę i ukształtowała polskie szkoły naukowe z tego zakresu badań, posiadające dziś znaczący dorobek publikacyjny i znaczącą kadrę naukową. Fundamenty badań nad regulacjami fizjologicznymi w zakresie rozrodu samicy, które zaważyły o rozwoju podstawowych badań nad regulacją rozrodu, stworzone zostały głównie w trzech ośrodkach naukowych przez trzech fizjologów:

- w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN przez fizjologa prof. Eugeniusza Domańskiego,
- w Instytucie Fizjologii Zwierząt Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie przez fizjologa prof. Tadeusza Krzymowskiego,
- w Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie przez fizjologa prof. Stanisławę Stokłosową.

Rezultatem rozwoju ośrodków w Jabłonnie, Olsztynie i Krakowie i miarą wskazującą na rozległość badań była i jest wykształcona tam i pracująca kadra naukowa profesorów i doktorów habilitowanych, skoncentrowanych na wyjaśnianiu nieznanych dotąd mechanizmów fizjologicznych regulacji rozrodu u samicy.

Łącznie we wspomnianych trzech ośrodkach zaangażowanych było około 30 samodzielnych pracowników naukowych, prawie wyłącznie skoncentrowanych na badaniach rozrodu u samicy. Jeśli liczbę profesorów i doktorów habilitowanych,

zaangażowanych w podstawowych badaniach fizjologicznych, porównać z liczbą pracowników zajmujących się fizjologicznymi badaniami stosowanymi (około 10 osób głównie w Instytucie Zootechniki i katedrach AR) lub badaniami z zakresu patologii rozrodu (około 10 osób z wydziałów medycyny weterynaryjnej) – to zrozumiała jest znacząca przewaga podstawowych badań fizjologicznych nad innymi. Jest to odwrotnie niż w większości państw europejskich i w innych krajach świata, gdzie zdecydowanie przeważają badania ukierunkowane na problematykę związaną z praktyką zootechniczną i weterynaryjną, a katedry fizjologii zwierząt zajmują się tradycyjnie innymi problemami niż rozród.

Należy odróżnić pojedyncze, nawet bardzo cenne publikacje, które włączają się w nurt badań światowych i uzupełniają je, od oryginalnych, własnych, konsekwentnie prowadzonych badań koncepcyjnych, zmierzających do pokazania nieznanych mechanizmów regulacyjnych. Te ostatnie stanowią istotny, liczący się dorobek polskiej szkoły naukowej, należy je zauważać i szczycić się nimi.

W Instytucie Fizjologii i Żywienia PAN w Jabłonnie utworzona została szkoła naukowa neuroendokrynologów. Jej specjalność to badania mechanizmów neuralnej, ośrodkowej regulacji rozrodu, a szczególnie badania mechanizmów regulacyjnych powiązanych z rozrodem w obszarze różnych jąder podwzgórza. Zespół pracowników przez około 40 lat – jak rzadko na świecie – konsekwentnie, niezależnie od względów koniunkturalnych, prowadził podstawowe, twórcze badania neuroendokrynologiczne, wykazując w swojej wąskiej, ale bardzo znaczącej specjalności, dużą konsekwencję i uzyskując liczący się dorobek naukowy.

Olsztyńska szkoła naukowa fizjologów skoncentrowała się na hormonalnej regulacji czynności narządów rodnych samicy, ze szczególnym uwzględnieniem regulacji lokalnych. Ze względu na bardzo liczny zespół pracowników prowadzących badania nad fizjologią rozrodu samicy, w ściśle ze sobą współpracujących dwóch instytucjach, a mianowicie w Katedrze Fizjologii Zwierząt UW-M i w Oddziale Endokrynologii i Patofizjologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, powstała licząca się szkoła naukowa, o szerokim profilu badań, ale konsekwentnie pogłębiająca wiedzę głównie w zakresie lokalnych regulacji hormonalnej czynności narządów rodnych samicy (jajnik, jajowód, macica) w cyklu i wczesnej ciąży.

W Krakowie powstał liczący się w nauce ośrodek wyspecjalizowany w badaniu mechanizmów regulacyjnych na poziomie komórki, który stworzył w Polsce i rozwinął badania oparte na metodach hodowli izolowanych komórek in vitro.

Potwierdzeniem tezy o dominacji badań fizjologicznych nad innymi w Polsce są dane w tabeli 5. Przedstawiciele nauk fizjologicznych – endokrynologii i neuroendokrynologii zajmują ponad połowę (54,1%) miejsc na liście najczęściej cytowanych osób z zakresu rozrodu kregowców.

Literatura

[1] Adams G.P., Sumar J., Ginther O.J. 1990: Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *J. Reprod. Fertil.* 90: 535–545.

[2] Armstrong D.T., Hansel W. 1959. Alteration of the bovine estrus cycle with oxytocin. *J. Dairy Sci*. 42: 533–542.

[3] Baerwald A.R., Adams G.P., Pierson R.A. 2002. Folliculogenesis revisited: characteristics of ovarian follicular waves during the menstrual cycle. *Fertil. Steril*. 78, Supplement 1, S67.

[4] Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destrempes M.M., Cammuso C., Williams J.L., Nims S.D., Porter C.A., Midura P., Palacios M.J., Ayres S.L., Denniston R.S., Hayes M.L., Ziomek C.A., Meade H.M., Godke R.A., Gavin W.G., Overstrom E.W., Echelard Y. 1999: Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol*. 17: 456–461.

[5] Barcikowski B., Carslon J.C., Wilson L., McCracken J.A. 1974. The effect of endogenous and exogenous estradiol-17β on the release of PGF2α from the ovine uterus. *Endocrinology* 95: 1340–1349.

[6] Bartlewski P.M., Beard A.P., Cook S.J., Chandolia R.K., Honaramooz A., Rawlings N.C. 1999: Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil*. 115: 111–124.

[7] Baruselli P.S., Mucciolo R.G., Visintin J.A., Viana W.G., Aruda R.P., Madureira E.H., Oliveira C.A., Molero-Filho J.R. 1997: Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Babalus bubalis*). *Theriogenology* 47: 1531–1547.

[8] BBC. Endangered animal clone produced http://news.bbc.co.uk/1/hi/sci/tech/2932225.stm. 2005.

[9] Blitek A., Waclawik A., Kaczmarek M.M., Stadejek T., Pejsak Z., Ziecik A.J. 2006. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the porcine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Reprod. Dom. Anim*. 41: 251–257.

[10] Bochenek M., Herjan T., Okolski A., Smorąg Z. 2005. Sperm chromatin abnormalities after semen sexing procedure – preliminary results. Havemeyer Foundation Workshop, 18–21 Sept. Kuhlungsborn, Germany, A15

[11] Bochenek M., Smorąg Z. 2005. Regulacja płci u bydła poprzez separacje plemników X I Y – wstępne wyniki badań. *Med. Wet*. 61: 50–52.

[12] Bochenek M., Smorąg Z., Pilch J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology* 56: 557–567.

[13] Brown P.C. 1944. Physiology and histological changes in the vagina of the cow during the estrual cycle. *Am. J. Vet. Res*. 5: 99–112.

[14] Brunner M.A., Donaldson L.E., Hansel W. 1969. Exogenous hormones and luteal function in hysteroctomized and intact heifers. *J. Dairy Sci*. 52: 1849–1854.

[15] Campbell K.H.S., Alberio R., Choi I., Fisher P., Kelly R.D.W., Lee J-H., Maalouf W. 2005. Cloning: Eight Years After Dolly. *Reprod. Dom. Anim*. 40: 256.

[16] Campbell K.H.S., Ritchie W.A., McWhir J., Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64–66.

[17] Chaves M.G., Aba M., Aguero A., Egey J., Berestin V., Rutter B. 2002: Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas. *Anim. Reprod. Sci*. 69: 37–46.

[18] Chesne P., Adenot P.G., Viglietta C., Baratte M., Boulanger L., Renard J.P. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol*. 20: 366–369.

[19] Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce dLn., Robl J.M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256–1258.

[20] Concannon P.W. 1983. Feline reproduction. W: Kirk R.W. (red.) Current Veterinary Therapy. VIII Small Animal Practice. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA: 932–936.

[21] Concannon P.W. 1983. Reproductive physiology and endocrine patterns of the bitch. W: Kirk R.W. (red.) Current Veterinary Therapy. VIII Small Animal Practice. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA: 886–901.

[22] Corner G.W. 1921. The ovarian cycle of swine. *Science* 53: 420–421.

[23] Dalin A.M., Nanda T., Hulten F., Einarsson S. 1995. Ovarian activity at naturally attained oestrus in the sow. An ultrasonographic and LH study. *Acta. Vet. Scand*. 36: 377–382.

[24] De Castro T., Rubianes E., Menchaca A., Rivero A. 1999. Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. *Theriogenology* 52: 399–411.

[25] Driancourt M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211–1239.

[26] Eurekalert. Texas A&M scientists clone world's first deer. Texas A&M http://www2.eurekalert.org/pub_releases/2003-12/tau-tas122203.php 2005.

[27] Evans A.C.O. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Dom. Anim*. 38: 240–246.

[28] Evans A.C.O. 2003: Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci*. 78: 289–306.

[29] Evans A.C.O., Duffy P., Hynes N., Boland M.P. 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53: 699–715.

[30] Fortune J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod*. 50: 225–232.

[31] Fortune J.E., Sirois J., Quirk S.M. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29: 95–109.

[32] Frank R.T. 1922. The ovary and the endocrinologist. *J. Am. Med. Assoc*. 78: 181–185

[33] Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424: 635.

[34] Geisert R.D., Zavy M.T., Moffatt R.J., Blair R.M., Yellin T. 1990. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J. Reprod. Fertil*. Suppl. 40: 293–305.

[35] Gilbert A.B., Perry M.M., Waddington D., Hardie M.A. 1983. Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fertil*. 69: 221–227.

[36] Ginther O.J. 1974. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways. A review. *J. Anim. Sci*. 39: 550–564.

[37] Ginther O.J. 1993. Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *J. Equine Vet. Sci*. 13: 18–25.

[38] Ginther O.J., Kastelic J.P., Knopf L. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci*. 20: 187–200.

[39] Ginther O.J., Kot K. 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 42: 987–1001.

[40] Ginther O.J., Kot K., Wiltbank M.C. 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 43: 689–703.

[41] Gonzalez de Bulnes A., Santiago Moreno J., Gomez-Brunet A., Inskeep E.K., Townsend E.C., Lopez-Sebastian A. 1999. Follicular dynamics during the oestrous cycle in dairy goats. *Anim. Sci*. 68: 547–554.

[42] Gregoraszczuk E. 1990. Different response of porcine large and small luteal cells to PRl in terms of progesterone and estradiol secretion. Exp. Clin. Endocrinol. 96: 234–237.

[43] Gregoraszczuk E., Dudek D., Wojtusiak A. 1990. The influence of PRL, LH alone and in combination upon progesterone secretion by porcine luteal cells in aggregate culture. *Endocrinol. Exp*. 24: 465–470.

[44] Gregoraszczuk E.L., Michas N. 1999. Progesterone and estradiol secretion by porcine luteal cells is influenced by individual and combined treatment with prostaglandins E2 and $F_{2\alpha}$ throughout the estrus cycle. *Prostaglandins and other Lipid Med*. 57: 231–241.

[45] Gregoraszczuk E.L., Ptak A. 2005. In vitro effect of leptin on growth hormone (GH)- and insuline-like growth factor-I (IGF-I)-stimulated progesterone secretion and apoptosis in developing and mature corpora lutea of pig ovaries. *J. Reprod. Dev.* 51(6): 727–33.

[46] Gregoraszczuk E.L., Ziecik J.A. 1998. TSH stimulates progesterone secretion by luteal cells throught activation cAMP/PKA signalling system – a potential involvement of PKC. *Theriogenology* 50: 945–953.

[47] Hansel W. 1967. Studies on the formation and maintenance of the corpus luteum. W: Reproduction in the Female Mammal. G.E. Lamming, E.C. Amoroso (red.), Butterworths, London: 356–365.

[48] Hansel W., Concannon P.W., Lukaszewska J. 1973. Corpora lutea of the large domestic animals. *Biol. Reprod.* 8: 222–245.

[49] Hayer P., Gunzel-Apel A.R., Luerssen D., Hoppen H.O. 1993. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J. Reprod. Fertil.* Supplement 47: 93–100.

[50] Heyman Y., Richard C., Rodriquez-Martinez H., Lazzari G., Chavatte-Palmer P., Vignon X., Galli C. 2004. Zootechnical performance of cloned bulls and their offspring. *Cloning Stem Cells* 6: 111–120.

[51] Hoffman B., Schams D., Bopp R., Ender M.L., Gimiez T., Karg H. 1974. Luteotropic factors in the cow: evidence for LH rather than prolactin. *J. Reprod. Fertil*. 40: 77–85.

[52] Hryniewicz A. 2006. Nauka, dydaktyka i edukacja. *Sprawy Nauki* 4: 23–31.

[53] Ireland J.J., Roche J.F. 1987. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. W: Roche J.F., O'Callaghan D. (red.) Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1–18.

[54] Jocelyn H.D., Setchell B.P. 1972. Regnier de Graaf's New treatise concerning the generative organs of women. *J. Reprod. Fertil.* Supp. 17: 77–209.

[55] Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult [see comments]. Science 282: 2095–2098.

[56] Kotwica J. 1980. Mechanism of PGF2a penetration from the horn of the uterus to the ovaries in pigs. *J. Reprod. Fertil*. 59: 237–241.

[57] Kotwica J., Bogacki M., Rekawiecki R. 2002. Neural regulation of corpus luteum in cow. *Dom. Anim. Endocrinol*. 23: 299–308.

[58] Kotwica J., Rękawiecki R., Duras M. 2004. Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. *Bull. Inst. Vet*. Pulawy 48: 139–145.

[59] Kotwica J., Skarżyński D., Bogacki M., Melin P., Starostka B. 1997. The use an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. *Theriogenology* 48: 1287–1299.

[60] Krzepinska A. 2006. Sprawy nauki, lipiec–sierpień

[61] Krzymowski T, Stefańczyk-Krzymowska S. 2004. The oestrous cycle and early pregnancy – a new concept of local endocrine regulation. *Vet. J.* 168: 285–296.

[62] Krzymowski T., Kotwica J., Okrasa S., Doboszyńska T., Zięcik A. 1978. Luteal function in sows after unilateral PGF2α infusion into the anterior uterine on different days of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 54: 21–27.

[63] Krzymowski T., Kotwica J., Stefańczyk S., Czarnocki J., Dębek J. 1982. A subovarian exchange mechanism for the countercurrent transfer of ovarian steroid hormones in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 55: 457–465.

[64] Krzymowski T., Kotwica J., Stefańczyk-Krzymowska S. 1990. Uterine and ovarian countercurrent pathways in the control of ovarian function in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 40: 179–191.

[65] Krzymowski T., Kotwica J., Stefańczyk-Krzymowska S., Czarnocki J., Koziorowski M. 1987. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ back transfer from the mesometrium vasculature into the uterus of the gilt during early pregnancy and estrogen-induced pseudopregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 13: 199–210.

[66] Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., Cheong H.T., Greenstein J.L., Im G.S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Hawley R.J., Prather R.S. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089–1092.

[67] Lanza R.P., Cibelli J.B., Moraes C.T., Farin P.W., Farin C.E., Hammer C.J., West M.D., Damiani P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2: 79–90.

[68] Manik R.S., Palta P., Singla S.K., Sharma V. 2002: Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 14: 315–325.

[69] McCracken J.A., Barcikowski B., Carlson J.C., Green K., Samulsen B. 1973. The physiological role of PGF2α in corpus luteum regression. *Adv. Biosci*. 9: 599–624.

[70] Mihm M., Baker P.J., Ireland J.L.H., Smith G.W., Coussens P.M., Evans A.C.O., Ireland J.J. 2006. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol. Reprod*. 74: 1051–1059.

[71] Mihm M., Bleach E.C.L. 2003. Endocrine regulation of ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 217–237.

[72] Modlinski J.A., Smorąg Z. 1991. Preimplantation development of rabbit embryos after transfer of embryonic nuclei into different cytoplasmic enivronment. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 361–372.

[73] Morre K., Thatcher W.W. 2006. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J. Dairy Sci*. 89: 1254–1266.

[74] Okuda K., Kasahara Y., Murakami S., Takahasi H., Woclawek-Potocka I., Skarżyński D.J. 2004. Regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by tumor necrosis factor-α and interferon-τ in bovine endometrial stromal cells. *Biol. Reprod.* 70: 191–197.

[75] Pierson R.A., Ginther O.J. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21: 495–504.

[76] Pierson R.A., Ginther O.J. 1988. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 29: 21–37.

[77] Płucienniczak G., Jagiełło A., Płucienniczak A., Hołody D., Strzeżek J. 1999. Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 52: 303–309.

[78] Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayares D.L., Colman A., Campbell K.H.S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86–90.

[79] Prather R.S., Barnes F.L., Sims M.M., Robl J.M., Eystone W.H., First N.L. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei és recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37: 859–866.

[80] Prather R.S., Sims M.M., First N.L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41: 414–418.

[81] Ptak A., Kajta M., Gregoraszczuk E.L. 2004. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured luteal cells collected from early-developing, mature, and regressing porcine corpora lutea. *Anim. Reprod. Sci*. 80: 267–279.

[82] Ptak A., Gregoraszczuk E.L. 2003. Growth hormone and insulin-like growth factor-I action on progesterone secretion by porcine corpora lutea isolated at various periods of luteal phase. *Acta Vet. Hung*. 51: 197–208.

[83] Rajakoski E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonally, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinol. Supplement* 52: 1–68.

[84] Rękawiecki R., Nowik M., Kotwica J. 2005. Stimulatory effect of LH, PGE_2 and noradreanline on STAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells: Possible mediation through progesterone. *Prostaglandins & Other Lipid Mediat*. 78: 169–184.

[85] Savio J.D., Keenan L., Boland M.P., Roche J.F. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil*. 83: 663–671.

[86] Shille V.M., Munro C., Farmer S.W., Papkoff H., Stabenfeldt G.H. 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. *J. Reprod. Fertil*. 69: 29–39.

[87] Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., Buck S., Murphy K., Lyons L., Westhusin M. 2002. Cell biology: a cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859.

[88] Sirois J., Fortune J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod*. 39: 308–317.

[89] Skarżyński D.J., Bah M.M., Wocławek-Potocka I., Deptuła K., Korzekwa A., Shibaya M., Pilawski W., Okuda K. 2003. Roles of tumor necrosis factor-α in the regulation of the estrus cycle in cattle: an in vivo study. *Biol. Reprod.* 69: 1907–1913.

[90] Skarżyński D.J., Jaroszewski J.J., Bah M.M., Deptuła K., Barszczewska B., Gawrońska B., Hansel W. 2003. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin $F_{2\alpha}$-induced luteolysis in cattle. *Biol. Reprod*. 68: 1674–1681.

[91] Skarżyński D.J., Miyamoto Y., Okuda K. 2000. Production of prostaglandin $F_{2\alpha}$ by the cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor-α: cell type specificity and intracellular mechanisms of action. *Biol. Reprod*. 62: 1116–1120.

[92] Skidmore J.A., Billah M., Allen W.R. 1995. The ovarian follicular wave pattern in the mated and non-mated dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *J. Reprod. Fertil*. Supplement 49: 545–548.

[93] Skrzyszowska M., Smorąg Z. 1989. Cell losses in bisected mouse, sheep and cattle embryos. *Theriogenology* 32: 115–122.

[94] Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L., Bochenek M. 1999. Cattle twins after transfer of demi-embryos derived from zona-perforated blastocysts. *J. Anim. Feed Sci*. 8: 223–231.

[95] Skrzyszowska M., Smorąg Z., Słomski R., Kątska-Ksiazkiewicz L., Kalak R., Michalak E., Wielgus K., Lehmann J., Lipinski D., Szalata D., Plawski A., Samiec M., Jura J., Gajda B., Ryńska B., Pieńkowski M. 2006. Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning. *Biol. Reprod*. 74: 1114–1120.

[96] Spencer T.E., Bazer F.W. 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2: 49–64.

[97] Stefańczyk-Krzymowska S., Chłopek J., Grzegorzewski W., Radomski M. 2005. Local transfer of prostaglandin E_2 into the ovary and its retrograde transfer into the uterus in early pregnant sow. *Exp. Physiol*. 90: 807–814.

[98] Stefańczyk-Krzymowska S., Krzymowski T., Einer-Jensen N., Kamiński T., Kotwica J. 1990. Local transfer of prostaglandin $F_{2\alpha}$ from the uterine lumen into the venous and arterial blood and into the uterine, mesometrial and ovarian tissue on day 18 of pregnancy in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* 23: 223–235.

[99] Stefańczyk-Krzymowska, S., Wąsowska B., Chłopek J., Grzegorzewski W. 2004. Retrograde transfer of steroid hormones to the ovary in luteal and follicular phase of porcine oestrous cycle in vivo. *Exp. Physiol*. 89: 1–5.

[100] Strzeżek J., Hołody D. 1996. Separation of 54 kDa glycoprotein with suppressive properties from boar seminal plasma. Adv. Contracteptive Deliv. Systems (USA). 12: 235–246.

[101] Strzeżek J., Hopfer E. 1987. Zinc ion-dependent protein in boar semen. *Anim. Reprod. Sci*. 13: 117–131, 138–142.

[102] Strzeżek J., Kordan W., Kostyra H., Zaborniak A. 1992. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. *Anim. Reprod. Sci.* 29: 35–52.

[103] Taneja M., Ali A., Singh G. 1996. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. *Theriogonology* 46: 121–130.

[104] Tarkowski A. 1961. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 190: 857–60.

[105] Tarkowski A.K. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184: 1286–1287.

[106] Thatcher W.W., Bartolome J.A., Sozzi A., Sivestre F., Santos J.E.P. 2004. Manipulation of ovarian function for the reproductive management of dairy cows. *Vet. Res. Comm.* 28: 111–119.

[107] Waclawik A., Rivero-Muller A., Blitek A., Kaczmarek M.M., Brokken L.J., Watanabe K., Rahman N.A., Ziecik A.J. 2006. Molecular cloning and spatio-temporal expression of prostaglandin F synthase and microsomal prostaglandin E synthase-1 in porcine endometrium. *Endocrinology* 147: 210–221.

[108] Waclawik A., Ziecik. A.J. 2006. Differentional expression of prostaglandin synthesis enzymes in conceptus during periimplantation period and endometrial expression of carbonyl reductase/prostaglandin 9-ketoreductase in the pig. *J. Endocrinol*. (w druku).

[109] Wakayama T., Perry A.C., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369–374.

[110] Wakayama T., Rodriguez I., Perry A.C., Yanagimachi R., Mombaerts P. 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 96: 14984–14989.

[111] Wayda E., Plucienniczak G., Jura A., Katska L., Skrzyszowska M., Smorąg Z. 1995. Molekularna metoda oznaczania płci zarodków bydlęcych wyhodowanych in vitro. *Med. Wet.* 51: 530–533.

[112] Willadsen S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryo. *Nature* 320, 63–65.

[113] Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813.

[114] Woods G.L., White K.L., Vanderwall D.K., Li G.P., Aston K.I., Bunch T.D., Meerdo L.N., Pate B.J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301: 1063.

[115] Wysocki P., Strzeżek J. 2003. Purification and characterization of a protein tyrosine acid phosphatase from boar seminal vesicle glands. *Theriogenology* 59: 1011–1025.

[116] Zhou Q., Renard J.P., Le Friec G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302: 1179.

[117] Ziecik A.J. 2002. Old, new and the newest concepts of inhibition of luteolysis during early pregnancy in pig. *Dom. Anim. Endocrinol*. 23: 265–275.

[118] Ziecik A.J., Shaw H.J., Flint A.P.F. 1980. LH luteal receptors during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 60: 129–137.

The most important achievements in mammalian biology reproduction in the world during last quarter of the century

Key words: biology of reproduction, achievements, mammals

Summary

On the basis of inquiry among 25 respondents from different countries, the most important achievements in mammalian reproductive biology were presented. Up to 22 topics were proposed in total. The first five positions among them, according to the number of votes, received the following accomplishments:

1) somatic cell cloning (Dolly) – 16,

2) understanding of follicular waves in some domestic animal species and new approaches to synchronization of ovulation in cattle – 10,
3) mechanism of luteolysis and control of CL function – 6,
4) sexing, spermatozoa and embryos – 6 and 5) maternal recognition of pregnacy – 6.

An attempt was made to analyse the scientific level of Polish research groups in comparison to the world's achievements on the basis of citation number according to SCI.

Most quotations of Polish scientists concern the mechanisms of luteolysis and control of corpus luteum function, maternal recognition of pregnacy as well as the embryonic and somatic cell cloning. The accurate examination of Polish reproductive biology contribution into worldwide acquirement indicates that the worked out list did not include andrology of reproduction, although the biology of male reproduction biology has in Poland a long tradition and incontrovertible achievements, especially concerning factors affecting production and quality of semen, proteomic of semen plasma and semen cryobiology. The highest number of quotations in worldwide bibliography belong to the representatives of andrology.

Summarizing the world achievements, it should be emphasized that the most important topics are these concerning biotechnology and biotechnics in reproduction as well as the studies explaining control of gonadal function.

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 29–41

Naukowe i praktyczne aspekty rozrodu bydła

Jan Kotwica[1], Tomasz Janowski[2], Edward Malinowski[3], Jędrzej Jaśkowski[4]
[1] Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn, 10-747 Olsztyn, ul. J. Tuwima 10
[2] Wydział Medycyny Weterynaryjnej, UW-M, Olsztyn, ul. M. Oczapowskiego 14, 10-719 Olsztyn
[3] Państwowy Instytut Weterynaryjny, Puławy, Oddział w Bydgoszczy, ul. Powstańców Wielkopolskich 10, 85-090 Bydgoszcz
[4] Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, AR Poznań, ul. Wojska Polskiego 52, 60-628 Poznań

Słowa kluczowe: bydło, rozród, biotechniki w rozrodzie

W Polsce jest obecnie około 2,7 mln krów mlecznych, podczas gdy stado krów ras mięsnych liczy tylko kilkanaście tysięcy sztuk. Pod kontrolą użytkowości było 18,9% krów mlecznych i w tej grupie średnia wydajność wynosiła 6500 kg mleka za okres 298 dni. Przeciętny okres międzywycieleniowy wynosił 416 dni, czyli okres jałowienia trwał średnio 5 miesięcy. Dane te odnoszą się do stad o średniej wielkości 28 krów.

Zaznaczyć należy, że przed okresem udomowienia bydła i ich mlecznym użytkowaniem, krowy wytwarzały taką ilość mleka, która miała zaspokoić potrzeby żywieniowe narodzonego cielęcia. Krowy ras mięsnych, które w tradycyjny sposób odchowują cielęta, wytwarzają 1000–1500 kg mleka podczas laktacji. W takiej sytuacji laktacja nie stanowiła zbyt dużego obciążenia organizmu matki, dlatego też energia i składniki paszy zapewniały zarówno homeostazę jej organizmu jak i regularną cykliczność procesów rozrodczych.

W takim ujęciu intensywna praca hodowlana, nakierowana na zwiększenie wydajności mlecznej, istotnie zmieniła ten stan, gdyż selekcja jakiejś cechy to jest także forma manipulacji genetycznej. Wiadomo bowiem, że wybór czyli selekcja jednej cechy sprawia, że pomniejszona zostaje szansa ujawnienia się innej cechy. Wynika to z teorii o samolubnym genie Richarda Dawkinsa [7]. Przypomnieć należy, że gen to tyle co przepis na białko. To instrukcja na syntezę białka w komórce, najczęściej białka enzymu kierującego ściśle określonym procesem w organizmie. Czyli gen realizując swój program, będzie uszczuplał możliwości ekspresji innego genu. Stąd też rozprzestrzenienie się jednej lub kilku cech pożądanych z punktu widzenia kierunku użytkowania zwierzęcia, ograniczy szanse ujawnienia się innych cech. Przy

czym te nieujawnione cechy (o czym nie wiemy na pewno) mogą okazać się ważne lub nawet bardzo ważne dla utrzymania stanu homeostazy, a więc stanu zdrowia zwierzęcia.

Zatem selekcja nakierowana na większą mleczność lub na przyrosty mięśni, w konsekwencji pomniejsza szanse zabezpieczenia, na niezbędnym poziomie, potrzeb bytowych zwierzęcia. Może to zaważyć na jego przyszłym zdrowiu oraz powiększy się prawdopodobieństwo wystąpienia zakłóceń w rozrodzie. Stąd już blisko do uprawnionej konkluzji, że większość problemów, z którymi mamy do czynienia w intensywnej hodowli, to cena za postęp osiągnięty w dążeniu do ekspresji cech, które wcześniej uznaliśmy za ważne.

Możliwe nawet, że wysokowydajne zwierzę zostało tak zmienione, iż szereg wcześniejszych przystosowań biologicznych, zapewniających homeostazę organizmu, zostało bezpowrotnie rozregulowanych i utraconych. Jeśli więc przedstawiona argumentacja jest poprawna, to doszliśmy w niej do punktu, który być może ułatwi pełniejsze zrozumienie nowych problemów wysoko intensywnej hodowli. Możliwe także, iż pozwoli to wyzbyć się złudzeń, że kiedyś problemy te definitywnie rozwiążemy. Raczej należy sądzić, że raz zachwiana homeostaza organizmu, taką już pozostanie na wiele lat. Może i na zawsze. Zmienne będą jedynie symptomy, za pomocą których zwierzę będzie nam to ujawniać.

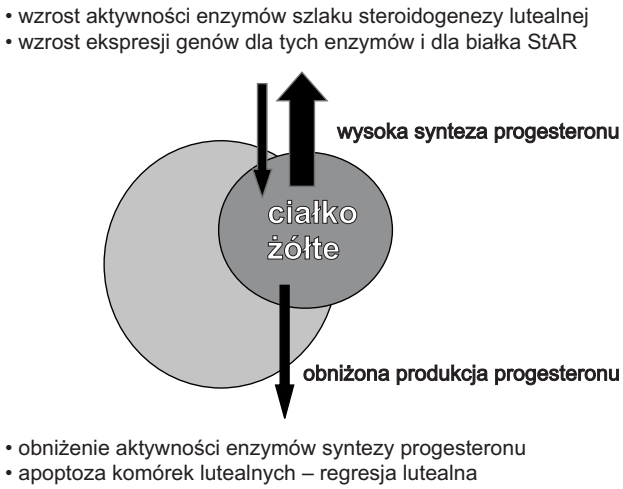
Dlatego zmiany genetyczne osiągnięte na drodze postępu hodowlanego sprawiły, że geny warunkujące mleczność, przesunęły wykorzystanie energii paszy na produkcję mleka, osłabiając szereg procesów składających się na zdrowie zwierzęcia i zakłócając procesy rozrodu. Wyraża się to między innymi zjawiskiem tzw. ujemnego bilansu energetycznego, powodującego utratę masy ciała nawet do 10–12% w pierwszych tygodniach laktacji. Stąd też jest normą w intensywnej hodowli, że wzrost wydajności mlecznej wymaga równolegle większych nakładów na ochronę zdrowia, wydłuża okresy międzywycieleniowe oraz powoduje, że wzrasta liczba zabiegów inseminacyjnych w celu uzyskania skutecznego zapłodnienia. Te zewnętrzne objawy są ilustracją poważniejszych zakłóceń ważnych procesów regulacyjnych zachodzących w organizmie.

Czego więc w tym kontekście dotyczą badania nad rozrodem u bydła? Badania fizjologiczne, które zeszły na poziom komórki oraz regulacji genowych, dotyczą mechanizmów selekcji i regulacji wzrostu pęcherzyka jajnikowego, regulacji czynności ciałka żółtego (CL), a w szczególności mechanizmu zapoczątkowania i przebiegu luteolizy, wpływu czynników żywieniowych na czynność macicy i jajnika, interakcji układu immunologicznego i endokrynnego w regulacji czynności ciałka żółtego oraz macicy w cyklu i ciąży. Badania z tego zakresu wykonywane w Polsce, a mieszczące się w głównym nurcie badań światowych, skoncentrowane są głównie w Olsztynie w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, a także w mniejszym zakresie na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej oraz w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Uszczegóławiając, badania te obejmują także:

- auto/parakrynną komunikację między komórkami układu rodnego;
- udział mechanizmów regulacyjnych (układ nerwowy, hormonalny, immunologiczny) w czynności komórek jajnika i macicy, tzn. jak specyficzne efektory w układzie rozrodczym zmieniają wrażliwość komórek docelowych na działanie hormonów;
- wyjaśnienie mechanizmów wewnątrzkomórkowych, za pomocą których komórki endokrynne są pobudzane lub hamowane;
- ważnym obszarem badań jest wpływ czynników środowiskowych czyli substancji czynnych roślin (fitoestrogenów), co ma związek z coraz częstszymi monodietami w żywieniu oraz wpływu skażeń środowiskowych (ksenobiotyków) na procesy rozrodu. W tym drugim jednak wypadku bydło jest obiektem badań, ale także dawcą tkanek do śledzenia procesów o charakterze ponadgatunkowym.

Najdłużej kontynuowane badania podstawowe obejmują czynność CL krowy, a w tym regulacyjny udział unerwienia adrenergicznego oraz oksytocyny jajnikowej (OT). W serii badań wykazano, że liczba błonowych β-receptorów w komórkach lutealnych jest zmienna w zależności od fazy cyklu rujowego i jest dodatnio skorelowana z obwodowym stężeniem progesteronu [55]. Adrenergiczna stymulacja jajnika (poprzez β-receptory) wywołuje gwałtowny wzrost uwalniania OT i progesteronu [34]. Wydaje się, że jest to szczególnie ważne w czasie krótkotrwałego stresu jako mechanizm ochrony wczesnej ciąży [32]. Tym bardziej, że farmakologiczna blokada β-receptorów obniża o 20–40% podstawową sekrecję progesteronu [36], a długotrwały stres powoduje tzw. down-regulation β-receptorów w CL [55]. Następnie wykazano skorelowaną zawartość noradrenaliny (NA) i dopaminy w CL [50], używając zaś skrawków CL lub izolowanych komórek lutealnych wykazano, że CL zawiera β-hydroksylazę dopaminy [35]. Zatem CL może syntezować NA z dopaminy jako prekursora. Dalej wykazano, że NA aktywując β_2-receptor wpływa na produkcję OT poprzez aktywację monooksygenazy peptydylo-glicylo-α-amidowej – enzymu odpowiedzialnego za potranslacyjne przemiany podczas syntezy OT [3], zaś poprzez β_1- i β_2-receptory NA oddziałuje na aktywność cytochromu $P450_{scc}$ oraz dehydrogenazę 3β-hydroxysteroidową [3, 49], tj. enzymów końcowego szlaku syntezy progesteronu. Ponadto NA wpływa na steroidogenezę na poziomie genowym, wywołując wzrost mRNA dla białka StAR i wspomnianych enzymów uczestniczących w syntezie progesteronu [57].

Zakwestionowano rolę oksytocyny jako czynnika inicjującego luteolizę w czasie cyklu rujowego u krowy [37] wskazano zaś, że to czas trwania wysokiego stężenia progesteronu, przy równoczesnym braku luteotropowego sygnału z blastocysty może być pierwszym krokiem ku luteolizie. Dostarczono dowodów na autoregulację syntezy progesteronu, który zwiększa aktywność enzymów uczestniczących w jego własnej syntezie przez ciałko żółte (CL) [33], a także wzmaga wzrost mRNA dla enzymów steroidogenezy w CL i równocześnie nasila proces ochrony komórek



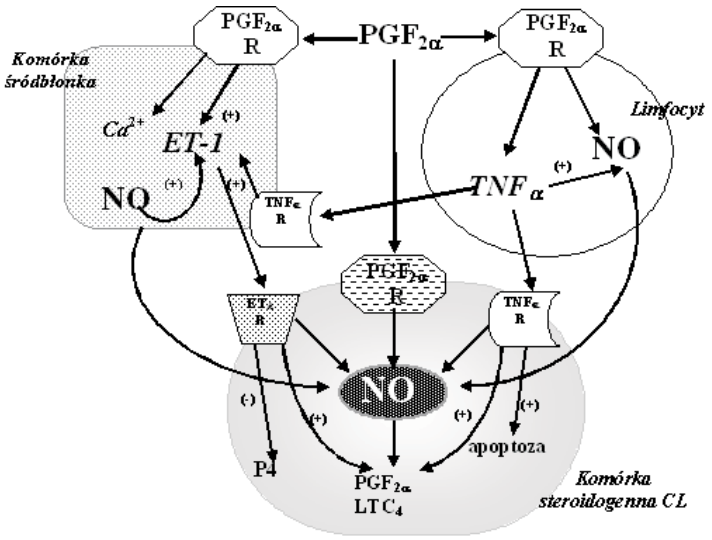
Rysunek 1. Schemat autoregulacji syntezy progesteronu w ciałku żółtym

lutealnych przed apoptozą [43]. Obniżenie zaś zdolności komórki do syntezy progesteronu włącza genetyczny program śmierci komórki [43] (rys.1). Możliwe, że uprawnia to do wyrażenia ogólniejszego poglądu: tak długo jak długo komórka wypełnia swoją specjalistyczną funkcję, włączone są w niej równolegle mechanizmy chroniące komórkę przed śmiercią, natomiast nasilone są genetyczne programy – ku życiu. Jeśli zahamowana lub obniżona zostanie podstawowa funkcja komórki, włączany jest genetyczny program jej śmierci.

Kolejny obszar badań dotyczy wpływu progesteronu na receptory OT w endometrium bydła i pozagenomowego działania progesteronu w komórkach CL. Wykazano, że progesteron oddziałując na poziomie błon komórkowych upośledza wiązanie się OT do własnego receptora i hamuje w ten sposób działanie OT w endometrium [4]. Ponadto wykazano pozagenomowe działanie progesteronu i szeregu innych steroidów na uwalnianie prostaglandyny E_2 w komórkach CL [8, 9]. Otrzymane dane pomagają pełniej zrozumieć mechanizm tzw. bloku progesteronowego u krowy.

Dostarczono także wiele danych dotyczących mechanizmu wpływu polichlorowanych bifenyli (PCBs) na motorykę mięśniówki macicy [67, 68] oraz czynność sekrecyjną komórek endometrium [69], miometrium (Wróbel – niepublikowane dane), komórek lutealnych [51–53] i komórek warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego krowy [51, 53, 54]. Ale uzyskano także interesujące dane, że szereg fitoestrogenów może pomniejszać lub znosić negatywny wpływ PCBs [Wróbel, Kotwica – dane niepublikowane). Możliwe więc, że odpowiednie żywienie może być istotnym czynnikiem znoszącym wpływ skażeń środowiskowych na rozród.

Równie ważny obszar podstawowych badań dotyczy wyjaśnienia przyczyn wczesnej zamieralności zarodków, a w szczególności wyjaśnienie endokrynnych, immunologicznych i biochemicznych mechanizmów zaangażowanych w regulację wydziela-



Rysunek 2. Hipotetyczny model interakcji pomiędzy komórkami steroidogennymi CL, komórkami śródbłonka i immunologicznymi w regulacji luteolizy u krowy [przedruk w modyfikacji za zgodą wydawcy; Korzekwa i in. 2006. *Animal. Sci. J*. 2007].

nia i działania metabolitów kwasu arachidonowego podczas cyklu jajnikowego i wczesnej ciąży. Badania te obejmują: określenie auto/parakrynnych mechanizmów regulujących rozwój, trwanie i regresję CL [1, 30, 60, 62] oraz mechanizmów regulujących cykliczne zmiany w błonie śluzowej macicy [61, 65], a w szczególności mechanizmów regulujących proliferację i apoptozę komórek [60]. Określono rolę tlenku azotu (NO) w luteolizie u krowy [30, 31, 59, 62] wykazując, że jest on głównym auto/parakrynnym pośrednikiem w działaniu macicznej $PGF_{2\alpha}$ podczas regresji CL krowy. Wykazano także, że NO jest syntezowany lokalnie w CL krowy zależnie od fazy cyklu rujowego [59], stymuluje uwalnianie prostaglandyn i hamuje syntezę progesteronu [30, 62] oraz aktywuje apoptozę komórek CL [31, 60] (rys. 2). Stosownie do stężenia NO w jajniku zmienia się aktywność enzymów odpowiedzialnych za jego powstawanie w przebiegu cyklu jajnikowego i jest najwyższa w późnej fazie lutealnej [59]. Podanie donora tlenku azotu bezpośrednio do jajnika (in vivo) bardzo silnie stymuluje wydzielanie prostaglandyn ($F_{2\alpha}$ i E_2) oraz leukotrienu C_4 [21], a nieselektywny inhibitor syntazy tlenku azotu podany bezpośrednio do jajnika (in vivo) stymuluje wydzielanie progesteronu oraz hamuje luteolityczne działanie analogu prostaglandyny $F_{2\alpha}$ [19, 21]. Donory NO hamują, a inhibitory syntazy NO stymulują wydzielanie progesteronu z komórek lutealnych bydła, przy czym siła ich działania jest zależna od rodzaju zastosowanej substancji [18]. Funkcja wydzielnicza komórek lutealnych bydla, poddanych stymulacji donorami tlenku azotu i inhibitorami syntazy tlenku azotu, jest zależna od kontaktu pomiędzy komórkami steroidogennymi i niesteroidogennymi [20]. Dane te wskazują na istotną rolę tlenku azotu w regulacji luteolizy u krów. Ponadto za ważne należy uznać wykazanie, iż zahamo-

wanie lokalnej syntezy NO w narządzie rodnym krowy powstrzymuje luteolizę indukowaną przez $PGF_{2\alpha}$ [59] oraz że jednymi z głównych czynników zaangażowanych w regulację luteolizy są cytokiny z nadrodziny TNF (TNFα, Fas-Fas-L) [58, 60, 62]. TNFα z jednej strony może uwalniać $PGF_{2\alpha}$ z macicy [58, 65], a z drugiej strony bezpośrednio działa na CL powodując jego regresję [60]. Wykazano także, że progesteron jest podstawowym czynnikiem zapobiegającym apoptozie komórek CL, indukowanej cytokinami [60] oraz że efekt działania i fizjologiczne znaczenie TNFα w układzie rodnym krowy zależą od stężenia tej cytokiny [58]. W niskiej dawce TNFα jest czynnikiem luteolitycznym, znaczny zaś wzrost koncentracji TNFα wzmaga aktywność CL i powoduje wydłużenie cyklu płciowego krowy. Wydzielanie $PGF_{2\alpha}$ przez TNFα jest hamowane przez INFτ, co może stanowić jeden z mechanizmów matczynego rozpoznania ciąży [Bah, Piotrowska, Skarżyński; dane niepublikowane].

Badania te zazębiają się z pracami nad rolą i mechanizmem działania interferonów (w tym interferonu tau) w interakcji pomiędzy komórkami endokrynnymi i immunologicznymi macicy w okresie wczesnego rozwoju i implantacji zarodka u krowy. Badania obejmują:

- wpływ IFN na proliferację, aktywację komórek układu immunologicznego [10], a także wpływ środowiska cytokinowego na produkcję IFN-tau przez zarodki [6];
- wpływ INF i cytokin na ekspresję receptorów steroidów jajnikowych (progesteronu i estradiolu) w komórkach immunokompetentych infiltrujących macicę we wczesnej ciąży;
- wewnątrzkomórkowy i molekularny mechanizm działania IFN – rola białek regulacyjnych STAT (Maj, Chełmońska-Soyta – dane niepublikowane).

Badając oddziaływanie nieodżywczych składników paszy (fitoestrogenów i ich aktywnych metabolitów) na wybrane procesy rozrodcze u krów, określono metabolizm izoflawonów w różnych fazach cyklu i we wczesnej ciąży [56, 64]. Substancje te i ich metabolity zaburzają syntezę i uwalnianie prostaglandyn z błony śluzowej macicy i z CL krowy w czasie cyklu i w okresie wczesnej ciąży [56, 64]. Ponadto stymulują one wzrost syntezy i uwalniania luteolitycznej $PGF_{2\alpha}$, co w konsekwencji może być przyczyną obniżonej płodności krów i zamierania zarodków [64, 66]. Wykazano istotne różnice w mechanizmie działania naturalnych estrogenów i fitoestrogenów w CL i śluzówce macicy oraz potwierdzono jedynie genomowy, zależny od jądrowych receptorów estrogenowych, mechanizm działania metabolitów izoflawonów [66].

Związek laktacji z procesami rozrodu u samic jest oczywisty. Z tego punktu widzenia stany zapalne gruczołu mlekowego, ich przyczyny oraz konsekwencje dla sukcesu rozrodczego są przedmiotem intensywnych badań także w Polsce. Patologia gruczołu mlekowego i laktacji obejmuje kliniczne i podkliniczne postacie mastitis u krów, zakażenia i zapalenia gruczołu mlekowego jałówek, zakaźne i niezakaźne zapalenia skóry wymienia i strzyków, wrodzone i nabyte zmiany w obrębie kanału strzykowego, nadmierny okołoporodowy obrzęk wymienia, krwiomleczenie, brak odruchu wydalania mleka, a także zaburzenia w przygotowaniu wymienia do nadcho-

dzącej laktacji. Najważniejszą grupę stanów patologicznych stanowią różne postacie mastitis jako reakcja organizmu krów na wtargnięcie drobnoustrojów do wnętrza wymienia. Zapalenia gruczołu mlekowego u krów wywoływane są przez ponad 150 rodzajów drobnoustrojów. Najważniejszą grupę wśród nich stanowią bakterie, chociaż stan ten wywoływany jest także przez mykoplazmy, grzyby, glony i wirusy. Dlatego badania obejmują inwentaryzację poszczególnych szczepów bakteryjnych w mleku [29, 41] oraz sposobów ich zwalczana [44, 46, 48]. W ostatnich latach odnotowano istotne zmniejszenie udziału *Streptococcus agalactiae*, a *Staphylococcus aureus* i gronkowce koagulazoujemne i bakterie środowiskowe (*Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*) są najczęstszą przyczyną zapaleń podklinicznych [47]. Towarzyszy temu wzrost zapaleń grzybiczych oraz pojawienie się zapaleń spowodowanych przez algi [42, 45]. Badania własne wskazują także na spadek skuteczności antybiotykoterapii [48]. Dlatego też coraz więcej uwagi poświęca się kojarzeniu antybiotykoterapii z immunomodulacją, czego efektem jest wzrost wyleczeń zapaleń gronkowcowych [63].

Wykazano ponadto, że zapalenie gruczołu mlekowego jest po części wynikiem obniżonej biodostępności pierwiastków śladowych oraz szeregu witamin. Uczestniczą one w utrzymaniu właściwego statusu antyoksydacyjnego, chroniącego organizm przed niekorzystnym oddziaływaniem reaktywnych form tlenu. Zjawisko to potwierdzają liczne badania oraz obserwacje kliniczne krów mlecznych. Do szczególnie niebezpiecznych form należą: anion nadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy i tlen singletowy. Charakteryzują się one bardzo silną reaktywnością chemiczną w stosunku do wszystkich molekularnych składników komórek gruczołu mlekowego, prowadząc do uszkodzeń wewnątrzkomórkowych biomolekuł a w następstwie do dysfunkcji komórek. Zespół niekorzystnych zjawisk zachodzących w komórce przejawia się reakcją zapalną, stanowiącą kompleksowy, lecz bardzo ukierunkowany zespół procesów fizjologicznych skierowanych na ograniczenie uszkodzeń i rozpoczęcie procesów naprawczych [24]. Szczególnie ważny w procesach naprawczych jest udział antyoksydantów i ich interakcja z mediatorami stanu zapalnego [27, 28]. Do najważniejszych czynników żywieniowych związanych z układem antyoksydacyjnym należy zaliczyć miedź, cynk, mangan, selen, kobalt, żelazo [26], witaminy A, E i C, β-karoteny, kwas fulwowy [25, 26]. Ponadto istotne znaczenie w profilaktyce występowania stanów zapalnych gruczołu mlekowego może mieć także biotyna, niacyna, ryboflawina, kwas pantotenowy, tiamina i witamina B_{12}.

Równie istotne z punktu widzenia praktyki hodowlanej, opieki weterynaryjnej, a także potrzeb dydaktycznych są badania dotyczące patologii rozrodu wykonywane w klinikach położniczych wydziałów medycyny weterynaryjnej. Badania te dotyczą przebiegu ciąży oraz zjawisk występujących w okresie poporodowym i obejmują etiopatogenezę, przeciwdziałanie wczesnej śmierci zarodkowej, przyczyny zaburzeń zdrowia noworodków w okresie neonatalnym [2], syntezę estrogenów w wymieniu krów w okresie przedporodowym i ich fizjologiczne znaczenie [13, 14] oraz biosyn-

tezę steroidów w łożysku krów z uwzględnieniem jego zatrzymania [12, 16, 17]. Szczególnie istotne są badania dotyczące okresu poporodowego z uwagi na problem odzyskiwania aktywności czynnościowej przez jajniki, inwolucję macicy oraz rozpoczynającą się laktację. Tego też okresu dotyczy mechanizm wpływu jakości żywienia na procesy rozrodu oraz etiopatogeneza i terapia anestrus i infekcji macicznych [40], a także wybór odpowiedniego terminu unasienniania dla uzyskania skutecznego zapłodnienia [38, 39]. Obiecujące wyniki uzyskano stosując hormonalne leczenie endometritis u krów w badaniach zespołu profesora T. Janowskiego [15].

Ograniczona objętość niniejszego artykułu nie pozwala na szczegółowe omówienie zalet i niestety ciągle licznych wad, którymi obciążone są nowe biotechniki oraz elementy biotechnologii wspomagające rozród, a będące na różnym etapie ich wdrożenia. Zatem należy jedynie zasygnalizować, że możliwości związane z zastosowaniem nasienia seksowanego – sortowanego i wynikającym z redukcji dawki inseminacyjnej obniżeniem wskaźnika zacieleń, zwiększyły zainteresowanie nowszymi technikami unasieniania [22]. Jedną z nich jest głęboka, domaciczna inseminacja nasieniem o zmniejszonej liczbie plemników w dawce. Jednakże depozycja wielu plemników w czasie owulacji może zwiększać ryzyko zapłodnień polispermicznych i stąd wczesnej śmiertelności zarodkowej, a także wzrostu defektów genetycznych. Należy w ogóle zauważyć, że na przestrzeni lat wskaźnik zacielenia krów obniża się od 0,5 do 1% rocznie. Nie jest jednak jasne czy zmiany te spowodowane są gwałtownym wzrostem genetycznej wartości krów, czy ich przyczyną jest raczej zmiany środowiskowe [5]. Faktem jednak jest, że w wyniku stosowania sztucznej inseminacji około 12% bydła na świecie jest w znacznym stopniu spokrewnione i ten stopień pokrewieństwa ciągle wzrasta. Warto przy tym dodać, że większość populacji holsztynofryzów pochodzi od 100 najlepszych ojców.

Pozyskiwanie zarodków in vivo przy użyciu metody MOET (Multiple Ovulation and Embryotransfer) ma wzrastające znaczenie komercyjne na świecie, to jednak w Polsce wykorzystanie transferu zarodków u bydła ma od lat charakter marginalny. Materiał do hodowli zarodków in vitro może być pozyskiwany poubojowo z jajników lub – co ma miejsce coraz częściej – przyżyciowo z zastosowaniem ultrasonografii. Jest to tzw. technika ovum pick-up (OPU), która – jak wykazano – nie ma istotnego wpływu na stan zdrowotny dawczyń. Jednakże wskaźnik zacieleń krów biorczyń zarodków świeżych oraz mrożonych wynosi odpowiednio 60–70% oraz 45–60% u jałowic i 40–50 oraz 30–40% u krów i jest nieznacznie niższy od wyników zacieleń uzyskiwanych po sztucznej inseminacji [70]. Jednakże spośród ciąż stwierdzonych po przeniesieniu zarodków klonowanych z komórek somatycznych bydła około 50% kończy się poronieniem [11]. Dlatego ważnym elementem sukcesu rozrodczego jest ocena zarodków przed ich transferem do macicy biorczyń. Generalnie, jakość zarodków hodowanych in vitro jest niższa niż uzyskanych in vivo. Wyraża się to zwiększoną częstością zaburzeń kariotypu, efektem czego jest opóźniony rozwój zarodków i w następstwie ich zamieranie. Przy czym zaznaczyć należy, że niższy wskaźnik zacieleń, wyższa częstość poronień i inne problemy charakterystyczne są zarówno dla

zarodków produkowanych in vitro jak i kolonowanych co ma związek z zaburzeniami rozwoju łożyska, licznymi wadami wrodzonymi czy też nadmierną masą rodzących się noworodków [23].

Jeśli chodzi o skutki populacyjne biotechnik stosowanych w rozrodzie, to dotąd brak jest długoletnich badań nad zdrowiem i płodnością osobników urodzonych z zarodków wyprodukowanych in vitro lub klonowanych. Wykazano jednak, że buhaje i jałówki urodzone z zarodków produkowanych in vitro z oocytów aspirowanych podczas OPU nie wykazywały większych zaburzeń w produkcji i reprodukcji, chociaż u buhajów z zarodków uzyskanych tym sposobem, notowano niższą objętość i koncentrację plemników.

Reasumując ten fragment badań można uznać, że nadzieje, iż za pomocą wymienionych biotechnik uda się w niedługim czasie osiągnąć znaczący postęp hodowlany są ciągle odległe.

Podsumowanie

W opracowaniu przedstawiono niektóre spośród badań prowadzonych w Polsce, dotyczących rozrodu krów, a które mieszczą się w głównym nurcie badań światowych. Badania te obejmują:

- regulację czynności ciałka żółtego,
- wpływ ksenobiotyków na czynność układu rodnego krowy,
- molekularne podstawy ciąży i wczesnej zamieralności zarodków,
- stany zapalne wymienia oraz procesy antyutleniające w gruczole mlekowym,
- gruczoł mlekowy jako źródło syntezy estrogenów,
- zależność między żywieniem a rozrodem,
- terapia stanów zapalnych macicy.

Ponadto dokonano przeglądu pewnych biotechnik i elementów biotechnologii wspomagających rozród krowy.

Literatura

[1] Bah M.M., Acosta T.J., Pilawski W., Deptula K.M., Okuda K., Skarzynski D.J. 2006. Role of intraluteal prostaglandin $F_{2\alpha}$, progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. *Prostagl. Other Lipid Mediat.* 79: 218–229.

[2] Błaszkowska M., Twardoń J. 2006. Wpływ koncentracji immunoglobin całkowitych w siarze i surowicy krów na poziom odporności biernej u potomstwa. *Med. Wet*. 62: 185–188.

[3] Bogacki M., Kotwica, J. 1999. Noradrenaline affects the post-translational synthesis of oxytocin in bovine corpus luteum. *Theriogenolgy* 52: 91–102.

[4] Bogacki M., Silvia W.J., Rękawiecki R., Kotwica J. 2002. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F2α from bovine endometrial tissue. *Biol. Reprod*. 67: 184–188.

[5] Boland M.P., Rizos D., Lonergan P. 2004. Embryonic losses in cattle. 20th Annual Meeting A.E.T.E. – Lyon, 10–11 Sept. 99–109.

[6] Chelmonska-Soyta A., Katska L., Kurpisz M., Stefaniak T., Zimecki M. 2001. The effect of Ureaplasma diversum activated mononuclear leukocytes on the development and interferon-tau production by bovine IVF-derived embryos. *J. Reprod. Immunol*. 51: 145–158.

[7] Dawkins R. 1996. Samolubny gen. Prószyński i S-ka, Warszawa.

[8] Duras M., Brzósko E., Kotwica J. 2005. Influence of progesterone, pregnenolone and 17β-hydroxy-progesterone on the function of bovine luteal cells treated with luteinizing hormone, noradrenaline and prostaglandin E2. *Pol. J. Vet. Sci*. 8: 113–119.

[9] Duras M., Mlynarczuk J., Kotwica J. 2005. Non-genomic effect of steroids on oxytocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F2α and E2 secretion from bovine endometrial cells. *Prostagl. Other Lipid Mediat.* 76: 105–116.

[10] Gierek D., Baczynska D., Ugorski M., Bazer F., Kurpisz M., Bednarski T., Gorczykowski M., Chelmonska-Soyta A. 2006. Differential effect of IFN-tau on proliferation and distribution of lymphocyte subsets in one-way mixed lymphocyte reaction in cows and heifers. *J. Reprod. Immunol*. 71: 126–131.

[11] Hill J.R., Long C.R., Lonney C.R., Winger Q.A., Spencer T.E., Bazer F.W., Burghardt R.C., Westhusin M.E. 2000. Placental abnormalities in first trimester somatic cell cloned fetuses. *Theriogenology* 53: 218 abstr.

[12] Janowski T. 1994 Gestagens in peripheral, uterine, ovarian and fetal blood in cows near term. *Exp. Clin. Endocrinol*. 102: 192–193.

[13] Janowski T., Zduńczyk S., Małecki- Tepicht J., Barański W., Raś A. 2002. Mammary secretion of oestrogens in the cow. *Domest. Anim. Endocrinol*. 23: 125–137.

[14] Janowski T., Zduńczyk S., Mwaanga E. S., Babiński J., Raś A. 2000. In vitro and in vivo investigations on the synthesis of estradiol 17b by the bovine mammary gland near term. *Domest. Anim. Endocrinol*. 35: 142–144.

[15] Janowski T., Zduńczyk S., Mwaanga E.S. 2001. Investigations on combined GnRH and PGF2α application in cows with endometritis puerperalis. *Reprod. Domest. Anim*. 36: 244–246.

[16] Janowski T., Zduńczyk S., Podhalicz-Dzięgielewska M., Raś A., Chmielewski A. 1995. Course of pregnancy, steroid hormone levels and maturation process of placentomes after oestrone infusion in cows near term. *J.Vet. Med*. A. 42: 345–350.

[17] Janowski T., Zduńczyk S., Podhalicz-Dzięgielewska M., Raś A., Chmielewski A. 1995. Effect of estrogen antagonist (tamoxifen) on steroid hormone levels, maturation process of placentomes and course of late pregnancy in cows. *Reprod. Domest. Anim.* 31: 378–742.

[18] Jaroszewski J.J., Bogacki M., Skarzynski D.J. 2003 Progesterone production in bovine luteal cells treated with drugs that modulate nitric oxide production. *Reproduction* 125: 389–395.

[19] Jaroszewski J.J., Hansel W. 2000. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolonges the life span of the bovine corpus luteum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 224: 50–55.

[20] Jaroszewski J.J., Skarzynski D.J., Blair R.M., Hansel W. 2003. Influence of nitric oxide on the secretory function of the bovine corpus luteum: dependence on cell composition and cell-to-cell communication. *Exp. Biol. Med*. 228: 741–748.

[21] Jaroszewski J.J., Skarzynski D.J., Hansel W. 2003 Nitric oxide as a local mediator of prostaglandin $F_{2\alpha}$-induced regression in bovine corpus luteum: an in vivo study. *Exp. Biol. Med*. 228: 1057–1062.

[22] Jaśkowski J.M. 2003. Postęp w biotechnologiach towarzyszących rozrodowi u bydła. *Życie Wet*. 77:

[23] Jaśkowski J.M., Traczykowski A. 2002. Syndrom dużego potomstwa. *Med Wet*. 58: 247–250.

[24] Kleczkowski M., Kluciński W., Jakubowski T., Sikora J. 2006. Dependence between acute phase response, oxidative status and mastitis of cows. *Pol. J. Vet. Sci*. 9: 151–158.

[25] Kleczkowski M., Kluciński W., Shaktur A., Sikora J. 2005. Concentration of ascorbic acid in the blood of cows affected with mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 49: 203–207.

[26] Kleczkowski M., Kluciński W., Sikora J., Kasztelan R., Zdanowicz M. 2002. Role of transition metals ion and reactive oxygen species in biological oxidation in cattle. (Part 1) *Pol. J. Vet. Sci.* 5: 263–268.

[27] Kleczkowski M., Kluciński W., Sikora J., Zdanowicz M. 2004. Role of the antyoxidants in the protection against oxidative stress in cattle – trace elements and enzymatic mechanisms. (Part 3) *Pol. J. Vet. Sci*. 7: 233–240.

[28] Kleczkowski M., Kluciński W., Sikora J., Zdanowicz M., Dziekan P. 2003. Role of the antyoxidants in the protection against oxidative stress in cattle – nonenzymatic mechanisms. (Part 2) *Pol. J. Vet. Sci.* 6: 301–308.

[29] Kłossowska A., Malinowski E. 2001. Drobnoustroje patogenne dla człowieka w mleku zbiorczym. *Med. Wet*. 57: 28–33.

[30] Korzekwa A., Jaroszewski J.J., Bogacki M., Deptula K.M., Maslanka T.S., Acosta T.J., Okuda K., Skarzynski D.J. 2004 Effects of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and nitric oxide on the secretory function of the bovine luteal cells. *J. Reprod. Develop.* 50: 411–417.

[31] Korzekwa A., Woclawek-Potocka I., Okuda K., Acosta T.J., Skarzynski D.J. 2007. Nitric oxide in bovine corpus luteum: possible mechanisms of action in luteolysis. *Anim. Sci. J*. 78.

[32] Kotwica J., Bogacki M., Rekawiecki R. 2002. Neural regulation of corpus luteum in cow. *Dom. Anim. Endocrinol.* 23: 299–308.

[33] Kotwica J., Rekawiecki R., Duras M. 2004. Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. *Bull. Inst. Vet*. Pulawy 48: 139–145.

[34] Kotwica J., Skarzynski D. 1993. Influence of oxytocin removal from corpus luteum on secretory function and duration of the oestrous cycle in cattle. *J. Reprod. Fert*. 97: 411–417.

[35] Kotwica J., Skarzynski D., Bogacki M., Miszkiel G. 1996. The influence of dopamine as a noradrenaline precursor on the secretory function of bovine corpus luteum using in vitro model. *Br. J. Pharmacol*. 118: 1669–1674.

[36] Kotwica J., Skarzynski D., Jaroszewski J. 1991. Involvement of β-adrenoceptors in the regulation of luteal function in cattle. *Br. vet. J*. 147: 189–196.

[37] Kotwica J., Skarzynski D., Bogacki M., Melin P., Starostka B. 1997. The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. *Theriogenology* 48: 1287–1299.

[38] Kozdrowski R., Dzięcioł M., Twardoń J., Dejneka G.J. 2005. Niewłaściwy termin unasienniania krów jako przyczyna powtarzania rui – skuteczność wybranych metod postępowania na przykładzie jednego stada. *Acta Sci. Ser. Med. Vet*. 4: 41–46.

[39] Kozdrowski R., Twardoń J., Dejneka G., Dzięcioł M. 2006. Wpływ nasilenia objawów rujowych oraz kondycji na wyniki unasienniania bydła. *Med. Wet*. 62: 1038–1040.

[40] Kozdrowski R., Twardoń J., Błaszkowska M., Dejneka G., Dzięcioł M. 2004. Bacterial flora obtained from uterine cervix after antibiotic and non-antibiotic treatment for puerperal metritis in cows. *J. Anim. Vet. Adv*. 3: 785–787.

[41] Kuźma K., Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A. 2005. Wytwarzanie enterotoksym oraz toksyny zespołu wstrząsu toksycznego przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane z mastitis u krów. *Med. Wet.* 61: 282–285.

[42] Lassa H., Malinowski E. 2005. Aktywność enzymatyczna drożdżaków i alg wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów. *Med. Wet.* 61: 673–675.

[43] Liszewska E., Rekawiecki R., Kotwica J. 2005. Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostagl. Other Lipid Mediat*. 78: 67–81.

[44] Malinowski E., Kłossowska A. 2003. Oporność na antybiotyki patogenów mastitis u krów. *Med. Wet*. 59: 230 – 235.

[45] Malinowski E., Kłossowska A., Lassa H. 2002. Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 46: 289–294.

[46] Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Lesiak M. 2004. Wrażliwość na antybiotyki laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych bakterii wyosobnionych z przypadków mastitis u krów. *Med. Wet.* 60: 176–180.

[47] Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Smulski S., Markiewicz H., Kaczmarowski M. 2006. Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland. *Pol. J. Vet. Sci*. 9: 191–194.

[48] Malinowski E., Pilaszek J., Kłossowska A., Sobolewska S., Sobolewski J. 1997. Zmiany wrażliwości na antybiotyki bakterii wyosobnionych z klinicznych postaci mastitis u krów w latach 1987–1996. *Med. Wet*. 53: 722–725.

[49] Miszkiel G., Kotwica J. 2001. Mechanism of action of noradrenaline on secretion of progesterone and oxytocin by the bovine corpus luteum in vitro. *Acta vet. Hung*. 49: 39–51.

[50] Miszkiel G., Skarzynski D., Bogacki M., Kotwica J. 1999. Concentrations of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and oxytocin in the corpora lutea of cyclic and in pregnant cattle. *Reprod. Nutr. Develop*. 39: 509–516.

[51] Młynarczuk J., Kotwica J. 2005. Influence of polichlorinated biphenyles on the secretion of oxytocin from bovine luteal cells and from granulosa cells obtained from the follicles of different size. *Pol. J. Vet. Sci*. 8: 261–267.

[52] Młynarczuk J., Kotwica J. 2006 Influence of polychlorinated biphenyls (PCBs) on LH-stimulated secretion of progestereone and oxytocin from bovine luteal cells obtained on different days of estrous cycle. *Pol. J. Vet. Sci.* 9: 101–108.

[53] Młynarczuk J., Kotwica J. 2006. Effect of polychlorinated biphenyls on the secretion of oxytocin from luteal and granulosa cells in cow: possible involvement of glucocorticoid receptors. *Vet.-Med. Czech* 51: 390–397.

[54] Młynarczuk J.J., Niewiadowska A., Kotwica J. 2005. Polychlorinated biphenyls impair FSH – stimulated effect on the secretion of steroids and oxytocin from cultured bovine granulosa cells. *Bull. Inst Vet. Pulawy* 49: 411–417.

[55] Pesta M., Muszynska A., Kucharski J., Superata J., Kotwica J. 1994. Beta-adrenergic receptors in corpora lutea from different stages of the estrous cycle in conscious and slaughtered cattle. *Biol. Reprod.* 24: 215–221.

[56] Piotrowska K.K., Wocławek-Potocka I., Bah M.M., Piskula M., Pilawski W., Bober A., Skarzynski D.J. 2006. Phytoestrogens and their metabolites inhibit the sensitivity of the bovine corpus luteum on luteotropic factors. *J. Reprod. Develop.* 52: 33–41.

[57] Rekawiecki R., Nowik M., Kotwica J. 2005. Stimulatory effect of LH, PGE2 and noradrenaline on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells: Possible mediation through progesterone. *Prostagl. Other Lipid Mediat.* 78: 169–184

[58] Skarzynski D.J., Bah M.M., Wocławek-Potocka I., Deptula K., Korzekwa A., Shibaya M., Pilawski W., Okuda K. 2003. Roles of tumor necrosis factor-α of the estrous cycle in cattle: an in vivo study. *Biol. Reprod.* 69: 1907–1913.

[59] Skarzynski D.J., Jaroszewski J.J., Bah M.M., Deptula K.M., Barszczewska B., Gawronska B., Hansel W. 2003. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin $F_{2\alpha}$-induced luteolysis in cattle. *Biol. Reprod*. 68: 1674–1681.

[60] Skarzynski D.J., Jaroszewski J.J., Okuda K. 2005. Role of tumor necrosis factor-α and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Dom. Anim. Endocrinol*. 29: 340–346.

[61] Skarzynski D.J., Miyamoto Y., Okuda K. 2000. Production of prostaglandin $F_{2\alpha}$ by the cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor-α: cell type specificity and intracellular mechanisms of action. *Biol. Reprod.* 62: 1116–1120.

[62] Skarzynski D.J., Okuda K. 2000. Different actions of noradrenaline and nitric oxide on the output of prostaglandins and progesterone in cultured bovine luteal cells. *Prostagl. Other Lipid Mediat*. 60: 35–47.

[63] Smith G.W., Lyman R.L., Anderson K.K. 2006. Efficacy of vaccination and antimicrobial treatment to eliminate chronic intrammmary *Staphylococcus aureus* infections in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 228: 422–425.

[64] Woclawek-Potocka I., Bah M.M., Korzekwa A., Piskula M., Wiczkowski W., Depta A., Skarzynski D.J. 2005. Soy-bean derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during cattle estrous cycle and early pregnancy. *Exp. Biol. Med.* 230: 189–199.

[65] Wocławek-Potocka I., Deptula K.M., Bah M.M., Lee H.Y., Okuda K., Skarzynski D.J. 2004. Effects of nitric oxide on production of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and E_2 in cultured bovine endometrial cells: cell type specificity. *J. Reprod. Develop*. 50: 333–340.

[66] Wocławek-Potocka I., Okuda K., Acosta T.J., Korzekwa A., Pilawski W., Skarżyński D.J. 2005. Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing prostaglandin $F_{2\alpha}$ synthesis via prostaglandin $F_{2\alpha}$ synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium. *Prostagl. Other Lipid Mediat.* 78: 201–217.

[67] Wróbel M., Kamiński K., Kotwica J. 2005. In vitro effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) on contractility of bovine myometrium from periovulatory stage of the estrous cycle. *Reprod. Biol*. 5: 303–319.

[68] Wróbel M., Kotwica J. 2005. Effect of polychlorinated biphenyls on basal and OT-stimulated calcium concentrations in myometrial cells in cow. *Reprod. Biol*. 5: 321–330.

[69] Wróbel M., Kotwica J. 2005. Influence of polychlorinated biphenyls (PCBs) and phytoestrogens on prostaglandins $F_{2\alpha}$ and E_2 secretion from bovine endometrial cells at postovulatory stage of the estrous cycle *Vet.-Med. Czech* 50: 487–495.

[70] Znaniecki R., Jaśkowski J.M., Znaniecka E. 1998. Wpływ niektórych czynników na wyniki zacieleń u jałowic biorczyń zarodków. *Med. Wet*. 54: 550–553.

Scientific and practical aspects of cattle reproduction

Key words: bovine, reproduction, biotechniques in reproduction

Summary

Paper presents the data on some up-to-date studies conducted in Poland which are contained in the main stream of world studies concerning cow reproduction. The studies include: (a) regulation of corpus luteum function, (b) effect of xenobiotics on the function of reproductive tract in cow, (c) molecular basis of the pregnancy and early foetus mortality, (d) udder inflammation, antioxidative processes and the mastitis, (e) mammary gland as a source of estrogens, (f) impact of nutrition on reproduction, (g) therapy of endometritis. Moreover, very brief review of some biotechniques applied in cow reproduction was presented.

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 43–64

Aktualne osiągnięcia naukowe i praktyczne w rozrodzie koni

***Kazimierz Kosiniak-Kamysz*[1], *Adam Okólski*[2]**
[1] *Katedra Hodowli Koni,*
[2] *Katedra Rozrodu i Anatomii Zwierząt,*
Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
e-mail: rzkosini@cyf-kr.edu.pl, rzokolski@cyf-kr.edu.pl

Słowa kluczowe: ogier, rozród, nasienie, testy biochemiczne, klacz, cykl rujowy, pęcherzyk, oocyt, zapłodnienie wspomagane

Wstęp

Aby przedstawić rozwój badań nad rozrodem koni należy odnieść się do niego w układzie historycznym. Konieczne jest porównanie postępu, jaki osiągnięto na przestrzeni wieków w stosunku do osiągnięć ostatniego półwiecza, a szczególnie ostatniego dwudziestolecia. Dynamika badań w tym zakresie związana jest z postępem naukowo-technicznym i wprowadzaniem nowych generacji aparatury badawczej, która pozwala na ocenę zachodzących przemian fizjologicznych oraz zmian patologicznych w układzie rozrodczym ogiera i klaczy. Szczególną rolę odegrała aparatura pozwalająca na badanie składu płynów ustrojowych (osocza nasienia, surowicy krwi), ocenę właściwości morfologicznych tkanek, a także komórek rozrodczych męskich i żeńskich.

Sięgając głębiej w historię badań nad rozrodem zwierząt, w tym również koni, można stwierdzić, że znaczący postęp notowano z wiekowymi interwałami: w XVII w. stwierdzono obecność plemnika (Leevenhoek), w XVIII w. pojawiły się pierwsze wzmianki o składzie osocza nasienia (Vauqvelin), w wieku XIX zainteresowano się sztucznym nasieniem u koni we Francji (Repiquet) oraz na Ukrainie (Chełchowski) [115].

Wiek XX już w I połowie przyniósł znaczący postęp, zwłaszcza w zakresie sztucznego unasieniania klaczy. Należy podkreślić doniosłą rolę, jaką w tym względzie odegrały szkoły naukowe Iwanowa i Miłovanowa w Rosji, a szczególnie Petersburska Szkoła, z której wyszło wielu wybitnych specjalistów, którzy zdynamizowali badania nad rozrodem zwierząt na całym świecie. Wśród nich należy

wymienić postać wybitnego uczonego prof. Romana Prawocheńskiego, dzięki twórczym myślom którego utworzona została w latach następnych Polska Szkoła Biologii Rozrodu Zwierząt, szeroko rozwinięta w latach późniejszych przez profesora Władysława Bielańskiego.

Szczególną rolę w badaniach nad rozrodem zwierząt odegrała światowej klasy Szkoła Naukowa Biochemii Nasienia utworzona w Cambridge przez profesora Tadeusza Manna. Osiągnięty w tym zakresie postęp polegał na precyzyjnej inwentaryzacji wielu składników osocza nasienia, poznaniu ich fizycznych i chemicznych właściwości, a zwłaszcza na określeniu relacji między poszczególnymi składnikami a plemnikiem.

Badania nad rozrodem zwierząt, a szczególnie koni, w Polsce zostały zdynamizowane po VIII Międzynarodowym Kongresie Rozrodu Zwierząt, który odbył się w Krakowie w 1976 r., a którego organizację powierzono prof. W. Bielańskiemu z uwagi na jego znaczącą pozycje naukową w świecie. Kongres odegrał ogromną rolę w rozwoju badań nad rozrodem koni, bowiem od tego czasu rozwijała się ścisła współpraca między polskimi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi.

Podjęta została współpraca między Krakowskim Ośrodkiem Naukowym a Centrum Badań nad Rozrodem Zwierząt w Cambridge, która miała na celu opracowanie metod przenoszenia zarodków z klaczy do klaczy. Zakończone powodzeniem badania, w rezultacie których w 1978 r. urodziły się pierwsze źrebięta po transplantacji zarodków przenoszonych (początkowo w jajowodzie królicy, a później również zarodków mrożonych), stworzyły podstawy do dalszych manipulacji z zarodkami, ich dzielenia, przenoszenia między koniowatymi o zróżnicowanych garniturach chromosomów, aż do otrzymania końskich klonów [115].

W tym okresie rozwijała się również współpraca między ośrodkami naukowymi w kraju, a wśród nich szczególnie Ośrodka Krakowskiego z Olsztyńskim Ośrodkiem Biochemii Nasienia oraz Wrocławskim Ośrodkiem Immunologii Rozrodu. Efektem tej współpracy są liczne publikacje, organizowane konferencje naukowe, jak też prowadzone kompleksowo projekty badawcze o istotnym znaczeniu poznawczym i stosowanym koordynowane sukcesywnie w kolejnych latach przez przedstawicieli tych ośrodków. Z całą pewnością możemy dzisiaj stwierdzić, że te pionierskie działania stworzyły fundament nowej dyscypliny naukowej, jaką jest biotechnologia w rozrodzie zwierząt.

Ogier

Ocena wartości rozrodowej ogiera

Stosowane powszechnie metody oceny płodności samców, a szczególnie ogierów, są często nie w pełni wiarygodne, z uwagi na występujące rozbieżności między stwierdzanymi wartościami badanych parametrów oceny a faktyczną płodnością. Konieczne jest zatem ciągłe doskonalenie metod oceny klinicznej i laboratoryjnej, celem określenia rzeczywistej wartości rozrodowej szczególnie młodych ogierów

kwalifikowanych do rozrodu, jak też weryfikowanie wartości ogierów już użytkowanych w rozrodzie, u których nastąpiły zmiany w okresie ich eksploatacji. Te dwie kwestie wymagają bardzo wnikliwego spojrzenia na przebieg procesów fizjologicznych związanych z jednej strony z dojrzewaniem płciowym, z drugiej zaś nad wpływem czynników patogennych powodujących ograniczenie wartości reprodukcyjnej [22, 33, 41, 120]. Rozwiązanie tych problemów leży u podstaw działania wielu ośrodków prowadzących badania nad rozrodem koni, jakkolwiek w tym względzie napotyka się na liczne sprzeciwy szczególnie hodowców, którzy ze względów ekonomicznych nie chcą się godzić na wycofywanie negatywnie ocenionych ogierów z użytkowania w rozrodzie. Podobne problemy występują na całym świecie, jednakże regulują to określone przepisy prawne. W związku z tym podejmowane są ciągle nowe badania nad określeniem wartości rozrodowej ogierów opartym na wieloczynnikowych uwarunkowaniach, które mają na celu przyjęcie jednolitego w tym zakresie systemu [61, 62].

Do interesujących ze względów utylitarnych należą badania nad oceną wartości rozrodowej całej populacji ogierów w stadninach państwowych (1057), które przeprowadzono w Polsce w latach 2003–2004 [55, 63]. Pozwoliły one na określenie stanu płodności ogierów należących do 6 ras. Kompleksowe badania przeprowadzone na 965 ogierach wykazały, że nasienie udaje się uzyskać od około 91% ogierów (877/965). Przyczyną trudności w uzyskaniu nasienia jest z reguły niskie libido, które obserwowano u ogierów problemowych, które są zwykle jednak młode i nie były wcześniej eksploatowane, a zatem odruchy płciowe nie zostały u nich przetorowane [57]. Od kilku ogierów nie udaje się pozyskać nasienia ze względów zdrowotnych (schorzenia kończyn, obrzęk moszny i jąder, płyn w mosznie). Od około 5% ogierów nie udaje się pobrać nasienia pomimo dobrego libido, co ewidentnie wskazuje, że ogiery te wykazują trudności w wyzwoleniu ejakulacji. Analiza ruchliwości plemników wykazuje, że ruchliwość w zakresie przyjętych norm (1/60–4/90) reprezentuje nasienie około 90% ogierów, od których pozyskano nasienie, u 10% zaś stwierdza się obniżoną ruchliwość plemników lub brak ich ruchliwości. Koncentracja plemników mieści się w granicach przyjętych norm (150×10^6 plemników w 1 ml) u 94,6% ogierów, u 5,4% zaś była znacznie niższa, nawet do pojedynczych plemników w polu widzenia.

Reasumując należy stwierdzić, że w populacji ogierów państwowych użytkowanych rozrodowo w terenie około 5–10% wykazuje obniżoną wartość nasienia (obniżoną ruchliwość oraz koncentrację plemników), a także trudności w ejakulacji i obniżone libido [57].

Inne, bardzo istotne z utylitarnego punktu widzenia, zagadnienie dotyczy fizjologicznego zróżnicowania wartości reprodukcyjnych ogierów dopuszczanych do rozrodu. Zagadnienie to sprowadza się do konieczności wprowadzenia systemu podziału ogierów na 3 kategorie pod względem wartości reprodukcyjnych, czego do tej pory w praktyce właściwie się nie stosuje, a co ma istotne znaczenie dla intensywności eksploatacji. Prowadzone w tym zakresie badania wykazują bowiem wysoką korelację między poziomami badanych wskaźników oceny laboratoryjnej a biologiczną wartością rozrodową ogierów podzielonych na 3 kategorie. Zarówno wcześniej uzyskane wyniki, jak też współczesna wiedza i możliwości badawcze pozwalają na

bardziej analityczne spojrzenie na to zagadnienie, doprowadzając w efekcie do wykazania czynników, na podstawie których można będzie kategoryzować ogiery, po to aby je użytkować zgodnie z ich reprodukcyjnymi uwarunkowaniami [58].

Rozpatrując problem oceny płodności ogierów w aspekcie klinicznym należy podkreślić, że znaczny postęp w tym zakresie osiągnięto dzięki z wprowadzeniu na szeroką skalę badań USG, które pozwalają zarówno na ocenę stanu funkcjonalnego tkanki jąder i najądrzy, jak też umożliwiają szczegółowe badanie struktury morfologicznej i funkcji fizjologicznych dodatkowych gruczołów płciowych, a także występujących w tym obszarze zaburzeń [45, 79, 82, 100, 123, 124].

Zagadnienia dotyczące rozrodowego użytkowania ogierów obejmują szerokie spektrum różnych czynników warunkujących płodność. Na obecnym etapie wiedzy oczywiste jest, że nie wystarcza w tym względzie jedynie ocena stanu klinicznego narządu rozrodczego, ocena libido i stwierdzenie ruchliwości plemników, co do niedawna stanowiło kryterium wystarczające do tego, aby ogiera zakwalifikować do rozrodu. Wykazano ponadto, że często nasienie charakteryzujące się dobrą ruchliwością i koncentracją plemników cechuje się niską płodnością. Dlatego też zaleca się prowadzenie kompleksowych badań opartych na analizie wartości wskaźników podstawowej oceny jakości nasienia, określonych składników biochemicznych osocza oraz zmian morfologicznych plemników.

Jako kryterium wartości referencyjnych przyjmuje się te wskaźniki i ich wartości, które reprezentują ogiery w średnim wieku 5–7-letnie, u których proces dojrzewania został zakończony, gdyż jak podają Kosiniak-Kamysz i in. [54] analiza wartości wskaźników oceny jakości nasienia u 5-, 6- i 7-letnich ogierów wykazała brak różnic między badanymi składnikami dopiero w tym przedziale wiekowym.

Stwierdzony brak istotnych różnic w ocenie wartości nasienia ogierów w tym wieku wydaje się uzasadniony, gdyż jak wykazują badania Dowsetta i Konotta [33], Kosiniaka-Kamysza [61, 62] oraz Podstawskiego i in. [95], ogiery osiągają pełną dojrzałość rozpłodową w wieku 4–5 lat i w tym też okresie stabilizują się wskaźniki oceny jakości nasienia w granicach norm fizjologicznych.

Jakkolwiek wskaźniki podstawowej oceny nasienia osiągają wartości optymalne w wieku około 4 lat, to zakres dobowej produkcji plemników oraz stan wydzielniczy dodatkowych gruczołów płciowych stabilizuje się dopiero pomiędzy 5 a 6 rokiem życia. W tym też wieku następuje optymalizacja produkcji androgenów, które administrują czynnościami reprodukcyjnymi u samca [59, 95].

Konserwacja nasienia ogiera

W okresie ostatniego 20-lecia notuje się rosnące zainteresowanie krótko- i długoterminową konserwacją nasienia ogierów. W badaniach przeprowadzonych przez Bittmar i Kosiniaka [8], Kosiniaka i in. [70], Shore i in. [107] stwierdzono, że nasienie nawet o niskich wskaźnikach oceny podstawowej może być przydatne do konserwacji w stanie płynnym, jeśli zastosuje się rozcieńczalnik wg Kenny'ego [51]. Bardziej złożonym zagadnieniem jest konserwacja nasienia w stanie zamrożonym, gdyż – jak wykazałz wcześniejsze badania – zaledwie 50% pozyskanych ejakulatów wykazuje

przydatność do konserwacji, a zaledwie połowa z nich spełnia warunki do tego, aby mogła być zastosowana po rozmrożeniu do AI klaczy [8, 42 ,85, 106].

Zróżnicowanie przydatności mrożeniowej nasienia ogierów skłania do prowadzenia wnikliwych badań nad czynnikami, które o niej decydują. Stąd też w dostępnej literaturze podkreśla się rolę wielu czynników związanych głównie z integralnością błon plemnikowych, które stanowią istotę tego zagadnienia. Wśród czynników warunkujących przydatność mrożeniową nasienia ogierów należy również wymienić uwarunkowania osobnicze, jak też rasę i sezon. Istotne znaczenie mają również czynniki technologiczne związane z pozyskiwaniem nasienia i jego podziałem na frakcje, które wykazują zróżnicowane w tym względzie wartości [59, 94].

Głębsze poznanie tych zagadnień pozwala na określenie czynników odgrywających istotną rolę w procesie kwalifikacji nasienia ogierów do konserwacji z równoczesnym przewidywaniem ich biologicznej wartości po rozmrożeniu [71, 98]. Jakkolwiek pojawiają się kontrowersyjne w tym względzie poglądy, zwracające uwagę na brak bezpośrednich zależności pomiędzy metodami oceny laboratoryjnej nasienia a jego zdolnością mrożeniową [72], to jednak biorąc pod uwagę liczne z tego zakresu prace wydaje się, że stanowisko takie nie jest zasadne. Znalezienie relacji między oceną laboratoryjną nasienia a jego biologiczną wartością, tak w odniesieniu do nasienia świeżego jak i mrożonego jest bowiem kluczem do rozwiązania problemu w aspekcie zarówno poznawczym jak i utylitarnym. Oparcie się tylko na próbach biologicznych ma swoje uzasadnienie, ale nie umożliwia poznania przyczyn zróżnicowanej wartości plemników, jak też możliwości selekcji nasienia do AI. Z tego też względu należy uważać, że podejmowane badania stanowią o postępie w zakresie seminologii poznawczej, jak też stosowania proponowanych testów oceny nasienia przeznaczonego do konserwacji oraz określenia jego wartości po rozmrożeniu.

Jak wynika z badań prowadzonych przez Bittmar i in. [9], Dowsetta i Knotta [32], Dowsetta i Pattie [33], Podstawskiego i in. [95], wiek ogiera jest jednym z czynników związanych z podatnością nasienia na zamrażanie. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że nasienie ogierów młodych, 3-, 4-letnich, mrozi się znacznie gorzej niż 8-, 12-letnich, a słabszą zamrażalność nasienia ogierów młodszych można tłumaczyć zarówno niższą koncentracją plemników w ejakulacie, która ma miejsce w tych przedziałach wiekowych, jak też mniejszą stabilnością struktur lipoproteidowych membran plemników.

W licznych badaniach wskazano też na znaczną dynamikę zmian w zakresie jakości nasienia ogiera zachodzączch w ciągu roku, jak i na istotne różnice w wartościach wskaźników oceny jakości nasienia ogierów różnych ras. Kosiniak-Kamysz i in. [56, 65] wykazali również związki zachodzące między zmiennymi wartościami badanych wskaźników oceny nasienia a jego przydatnością do kriokonserwacji. Ocena zamrażalności nasienia ogierów 5 ras wykazała, że najwięcej, bo aż 91%, nasienia pochodzącego z ejakulatów pobranych od ogierów szlachetnej półkrwi, po zamrożeniu i rozmrożeniu spełniało kryteria nasienia użytkowego, podczas gdy u ogierów półkrwi, hucułów i zimnokrwistych odsetek ten wahał się od 65 do 50%,

a u ogierów śląskich nie przekraczał 38%. Wyjaśnieniem tych rezultatów jest porównanie średnich wartości wskaźników oceny jakości nasienia świeżego, z którego wynika, że właśnie w nasieniu ogierów szlachetnej półkrwi notowano najwyższą średnią ruchliwość plemników, sięgającą 74% przy średnim odsetku plemników o ruchu postępowym wynoszącym 2,4 (wg przyjętej skali). Najniższe wartości tych wskaźników stwierdzono natomiast w nasieniu ogierów śląskich.

W nasieniu ogierów szlachetnej półkrwi zanotowano także najniższy odsetek plemników z kroplą cytoplazmatyczną, przy najwyższym udziale plemników z tą zmianą u ogierów śląskich [56, 64, 65, 97, 99].

Przeprowadzona ocena zamrażalności nasienia ogierów w okresie od września do stycznia wykazała, że we wrześniu na poziomie użytkowym zamraża się skutecznie tylko 25% ejakulatów, podczas gdy w kolejnych miesiącach odsetek ten wzrastał od 56 do 74%.

Wydaje się, że tak słaba zamrażalność nasienia ogierów we wrześniu, korespondująca ze znacznie gorszymi wskaźnikami oceny jakości nasienia w tym miesiącu niż w pozostałych, może być wynikiem przypadającej na ten okres obniżonej aktywności jąder [47, 119]. Inną przyczyną może też być przerwa w pobieraniu nasienia, na co wskazuje analiza jego zamrażalności w pierwszych ejakulatach pobranych po przerwie, wśród których na poziomie użytkowym zamroziło się tylko 38,8%, podczas gdy w kolejnych pobraniach odsetek ten wzrastał do ponad 60% [95]. Stwierdzone niższe wartości wskaźników oceny jakości nasienia rejestrowane we wrześniu i październiku są zgodne z obserwacjami Udały i in. [119], którzy analizując nasienie ogiera w ciągu roku największy procent plemników ruchliwych notowali w grudniu i styczniu.

Prowadzone od wielu lat przez Ośrodek Krakowski badania nad nasieniem ogierów opierają się głównie na frakcji bogatej w plemniki, co jest często poddawane w wątpliwość z uwagi na podkreślaną rolę wszystkich składników nasienia występujących w pełnym ejakulacie. W związku z tym określono przydatność do mrożenia poszczególnych frakcji ejakulatu ogiera na podstawie wybranych wskaźników i wartości nasienia i osocza. Badania te należą do unikalnych z uwagi na określenie wartości każdego badanego wskaźnika pochodzącego z trzech frakcji ejakulatu o zróżnicowanych wartościach oceny podstawowej nasienia odnosząc je do efektów uzyskanych po zamrożeniu.

Analiza średnich wartości wskaźników oceny jakości nasienia w kolejnych frakcjach ejakulatów oraz aktywności LDH i zawartości białka całkowitego wykazała, że parametry te różniły się statystycznie istotnie we frakcjach I i II i były istotnie wyższe niż we frakcji III. Zamrażalność badanych frakcji nasienia wykazała, że około 70% zamrożonych i rozmrożonych próbek frakcji I i II spełniało kryteria nasienia użytkowego, natomiast żadna z próbek frakcji III nie spełniała tych kryteriów [50, 59, 94], co decyduje o braku przydatności tej części ejakulatu do mrożenia.

Inną metodą oceny jakości nasienia jest jego filtracja przez kolumny sephadex G-15 i wełnę szklaną. Wykazano, że pomiędzy wartością współczynników filtracji

rozmrożonego nasienia a płodnością samic unasienianych wytestowanym tą metodą nasieniem występują istotne korelacje [53, 105, 106]. Stwierdzono, że przy lepszej ruchliwości plemników w nasieniu świeżym notuje się odpowiednio wyższe współczynniki filtracji, tak w nasieniu świeżym jak i mrożonym. Wykazano również, że wartości tych parametrów w I i II frakcji ejakulatu ocenione po zamrożeniu jako przydatne do inseminacji były statystycznie istotnie wyższe niż we frakcji III określonej jako nieprzydatna do mrożenia.

Oceniając przydatność poszczególnych frakcji ejakulatu do mrożenia stwierdzono, że w III frakcji wartości współczynników filtracji są niższe, a aktywności LDH i zawartości biała całkowitego – wyższe w porównaniu z frakcjami I i II . Świadczy to o braku przydatności tej frakcji do mrożenia, co dodatkowo uzasadnia jej eliminacje podczas pobierania nasienia z rozdziałem na frakcje. Stwierdzono ponadto, że gdy I frakcja ejakulatu nie zamrażała się na poziomie użytkowym, to również frakcja II i III tego ejakulatu nie były przydatne do mrożenia [94, 96].

Testy enzymatyczne stosowane w ocenie wartości nasienia ogiera i jego przydatności

Prowadzone na przestrzeni lat badania nasienia doprowadziły do ustalenia czynników, które odpowiadają za wystąpienie różnic w zakresie wartości ejakulatów pozyskiwanych od ogierów. Niektóre z badanych czynników można zastosować jako markery w ocenie wartości nasienia oraz jego przydatności do kriokonserwacji.

Pomimo że badania wielu autorów potwierdzają, że zachodzą istotne korelacje pomiędzy koncentracją plemników, odsetkiem plemników o ruchu postępowym i prawidłowej budowie morfologicznej a procentem zaźrebień klaczy, to wielokrotnie podkreślano, że makro- i mikroskopowa ocena nasienia nie jest wystarczająca do określenia jego rzeczywistej wartości [11, 46, 47]. Wykazywano często, że nasienie charakteryzujące się dobrą ruchliwością i koncentracją plemników cechuje się niską zdolnością do zapłodnienia [32, 113]. Zjawisko to przez wielu autorów tłumaczone jest zaburzeniami w przepuszczalności błon komórkowych i uwalnianiem się enzymów plemnikowych do plazmy nasienia, który to proces jest niewidoczny w mikroskopowej ocenie opartej głównie na ocenie ruchliwości plemników [91, 112]. Z tych też powodów Krakowski Ośrodek prowadzi od wielu lat badania nad możliwością wykorzystania składników biochemicznych osocza nasienia do oceny wartości nasienia ogiera. Oceniano poziomy takich składników jak glicerofosfocholina, ergotioneina, fruktoza oraz inne, które niestety nie znalazły zastosowania w praktyce.

W związku z tym od 15 lat badania te koncentrują się wokół enzymów metabolicznych, zarówno pochodzenia plemnikowego jak i tkankowego, pochodzących z wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych. Z tego obszaru badań opublikowano 15 prac, w których nie tylko scharakteryzowano zakres aktywności AspAT, LDH oraz zawartości białka całkowitego w nasieniu ogierów różnych ras, w różnym wieku oraz w różnych okresach roku, ale przede wszystkim przedstawiono relacje zachodzące

między tymi składnikami a makro- i mikroskopowymi wskaźnikami oceny jakości nasienia (objętością, ruchliwością, koncentracją i morfologią plemników). Stwierdzono istotne korelacje między analizowanymi składnikami osocza a podstawowymi wskaźnikami oceny nasienia oraz określono zależności między tymi parametrami, co pozwoliło na opracowanie testów, dzięki którym można prognozować efekty zamrażalności każdego ejakulatu pozyskanego od ogiera. Opierając się na ocenie ruchliwości i koncentracji plemników oraz równoczesnym pomiarze aktywności AspAT lub LDH bądź też zawartości białka całkowitego można prognozować efekty zamrażalności nasienia z prawdopodobieństwem 85%, eliminując jednocześnie z mrożenia około 50% ejakulatów więcej niż wówczas, gdy ich kwalifikacja do mrożenia była oparta tylko na ocenie ruchliwości i koncentracji plemników [8, 7, 60, 66, 71]. W badaniach własnych potwierdzono także wcześniejsze obserwacje, w których wykazano, że wysoka aktywność AspAT i LDH świadczy o złej jakości nasienia samców [67, 91, 109]. Wykazano jednak, że nie zawsze niska aktywność tych enzymów jest wskaźnikami dobrej jego jakości, gdyż stwierdzono że aktywność tych enzymów skorelowana jest ujemnie z odsetkiem plemników z kroplą cytoplazmatyczną witki, która wiąże te enzymy co stwierdził VonWitze [121]. Stąd też wniosek, że nasienie z dużą liczbą kropli cytoplazmatycznych, a więc złej jakości, może charakteryzować się niską aktywnością tych enzymów. Dlatego też uwzględniając wymienione zależności należy podkreślić, że pomiar aktywności AspAT i LDH w osoczu nasienia ogiera może być dobrym wskaźnikiem jego wartości, ale w połączeniu z oceną morfologiczną plemników [71].

W ostatnich latach podjęto także badania nad pomiarem aktywności fosfatazy alkalicznej (AP) w osoczu nasienia ogiera, która często służy jako wskaźnik w diagnostyce układu rozrodczego samca. Badania przeprowadzone przez Głogowskiego [38, 39] wykazały, że niska aktywność fosfatazy alkalicznej (AP) charakteryzuje nasienie samców z oligospermią. Potwierdzili to także inni autorzy, którzy wykazali, że niski poziom aktywności AP (<100 $U \cdot L^{-1}$) cechuje nasienie z azoospermią, czyli z zaburzeniami funkcji jąder. Autorzy ci podają także, że w nasieniu z azoospermią może wystąpić również wysoki poziom AP będący następstwem zmian patologicznych w obrębie gruczołów dodatkowych [35, 117, 118].

Interesujące z klinicznego i poznawczego punktu widzenia było określenie aktywności tego enzymu w nasieniu ogiera pod kątem oceny jego wartości. W badaniach przeprowadzonych na 198 ogierach należących do 5 ras – przy zastosowanym podziale pozyskanych ejakulatów na dwie grupy o zróżnicowanej ruchliwości i koncentracji plemników – stwierdzono, że średnia aktywność fosfatazy w 110 ejakulatach zakwalifikowanych do grupy I (o wartościach wyższych) wynosiła 27,7 $U \cdot cm^{-3}$ i była prawie dwukrotnie wyższa od średniej aktywności tego enzymu w 91 ejakulatach zakwalifikowanych do grupy II (o wartościach niższych), w których wynosiła 14,4 $U \cdot cm^{-3}$. Okazało się ponadto, że AP [$U \cdot cm^{-3}$] koreluje istotnie ($p < 0,01$) dodatnio z koncentracją plemników, odsetkiem plemników o ruchu postępowym

(0,24) oraz ujemnie z objętością ejakulatu (–0,4). Z wstępnie przeprowadzonych badań wynika, że stwierdzona korelacja między aktywnością AP a liczbą plemników o ruchu postępowym (w ramach ogólnej koncentracji plemników) stwarza możliwość wykorzystania także tego enzymu jako markera w ocenie wartości nasienia ogiera [69].

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 [6]. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez Luberdę i Strzeżka [80] oraz Strzeżka [110], wzrost poziomu RFT przejawia się zaburzeniami ruchliwości plemników, ich przeżywalności, destabilizacji chromatyny oraz utraty ich zdolności do reakcji akrosomowej. Z tych też względów podjęto szersze badania nad oceną całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (TAS) osocza nasienia ogiera. W badaniach przeprowadzonych na 164 ogierach należących do 5 ras stwierdzono, że zawartości TAS w osoczu nasienia ogierów śląskich oraz zimnokrwistych wynoszą średnio 2,6 $\mu mol \cdot cm^{-3}$ i są statystycznie istotnie wyższe ($p < 0,05$) niż u ogierów ras małopolskiej, wielkopolskiej oraz szlachetnych półkrwi, u których rejestrowano średnio 1,6 i 1,7 $\mu mol \cdot cm^{-3}$ [67, 111].

Przeliczając natomiast zawartość TAS na koncentrację plemników o ruchu postępowym [$\mu mol \cdot 10^{-9}$ rp] stwierdzono, że TAS wyrażony w tych jednostkach koreluje istotnie ($p < 0,01$) ujemnie: z ogólną koncentracją plemników, z koncentracją plemników o ruchu postępowym, odsetkiem plemników ruchliwych oraz poruszających się ruchem postępowym, a także dodatnio z TAS wyrażonym [$\mu mol \cdot cm^{-3}$] przy współczynniku korelacji 0,71. Z wstępnie przeprowadzonej analizy statystycznej wyników można sądzić, że również pomiar zawartości TAS w osoczu nasienia ogierów wyrażony w [$\mu mol \cdot 10^{-9}$ rp] może być dobrym wskaźnikiem oceny jego wartości [68, 73, 111].

Po przeprowadzeniu biochemicznej oceny uszkodzeń lub zmian przepuszczalności błon plemnika – na podstawie pomiaru aktywności enzymów metabolicznych, antyoksydacyjnych bądź akrosomalnych plemnika uwolnionych do płynu zewnątrzkomórkowego czyli osocza nasienia, interesujące wydawało się uzupełnienie jej o ocenę integralności błon plazmatycznych plemników w mikroskopie fluorescencyjnym. Dlatego też podjęto badania nad oceną rezystencji błon plazmatycznych plemników metodą fluorescencji w preparatach barwionych fluorochromem, a wartość nasienia określano na podstawie odsetka plemników świecących, czyli z uszkodzonymi błonami komórkowymi [36]. Badania te, podobnie jak poprzednie dotyczące fosfatazy alkalicznej oraz antyoksydantów, są w trakcie realizacji i rokują nadzieję na opracowanie kolejnego testu oceny laboratoryjnej wartości nasienia.

Inne czynniki warunkujące płodność ogierów

Do istotnych osiągnięć ostatnich lat zaliczyć można badania nad wpływem niedoborów mineralnych (makro- i mikroskładników) w diecie i ich wpływu na płodność ogierów. Danek i in. [26, 27, 28, 29, 30] wykazali , że ogiery żywione paszą z niedoborem cynku mają słabsze libido i gorszą jakość nasienia. Podobne wyniki stwierdzono w badaniach przeprowadzonych przez Krakowski Ośrodek, w których wykazano ponadto odwrotne zależności w zakresie wpływu kadmu na jakość nasienia. Stwierdzono, że ważną rolę w funkcjach płciowych samców odgrywa również magnez, gdyż obserwowano zależności zachodzące między jego poziomemw diecie a wskaźnikami oceny jakości nasienia. Badania prowadzone przez Danka i in. [23] wnoszą też cenne informacje na temat zakażeń bakteryjnych układu rozrodczego ogiera przez różne drobnoustroje.

Istotne znaczenie dla praktyki weterynaryjnej mają również wyniki uzyskane w badaniach nad wpływem leków przeciwzapalnych na jakość nasienia ogierów. Wykazano w nich szczególnie niekorzystny wpływ deksametazonu na większość cech nasienia oraz osocza nasienia, podkreślając równocześnie zmiany w zakresie stężenia białka całkowitego, żelaza oraz aktywności AP [24, 25].

Do liczących się w literaturze należą prace dotyczące wpływu endotoksyny bakteryjnej (lipopolisacharydu, LPS) na płodność ogierów. Wykazano eksperymentalnie, że podanie pojedynczej dawki lipopolisacharydu *Escherichia coli* powoduje zmiany kliniczne, hematologiczne oraz hormonalne (spadek stężenia testosteronu we krwi i nasieniu), a także zmiany w składzie osocza nasienia i obrazie morfologicznym plemników, będące wynikiem zaburzeń funkcji jądra. W trakcie tych badań stwierdzono, że u ogierów poddanych działaniu LPS występują zaburzenia w zakresie termoregulacji jąder w czasie endotoksemii. Okazało się również, że zastosowanie niesteroidowego leku przeciwzapalnego megluminianu fluniksyny (FM) skutecznie przeciwdziała zmianom wywołanym przez endotoksyny u ogierów, co jest wskazaniem do stosowania odpowiedniego typu terapii podczas endotoksemii u ogiera [24].

Podsumowanie

W okresie ostatniego dwudziestolecia osiągnięto znaczący postęp w zakresie badań nad rozrodem koni. Należy jednak podkreślić, że doniosłą rolę w tym względzie odegrały badania prowadzone w okresie wcześniejszym, które miały charakter głęboko poznawczy. Do największych należą osiągnięcia o ponadczasowym wymiarze dotyczące poznania właściwości składników biochemicznych zawartych w nasieniu oraz określeniu ich roli w relacji z plemnikiem, czego dokonał na przestrzeni pięćdziesięciolecia profesor Tadeusz Mann.

Zagadnieniem o wiodącym charakterze, w odniesieniu do badań nad przebiegiem procesów rozrodczych u ogiera, jest określenie biologicznej wartości

nasienia oparte na badaniach klinicznych układu rozrodczego oraz laboratoryjnej ocenie nasienia.

Znaczący postęp w ostatnich latach osiągnięto w zakresie badania klinicznego układu rozrodczego u ogiera dzięki wprowadzeniu do praktyki badań ultrasonograficznych. Dzięki opracowanym technikom badawczym i konstrukcyjnym głowic USG możliwe stało się nie tylko badanie struktur morfologicznych jąder i najądrzy, ale przede wszystkim badanie dodatkowych gruczołów płciowych, które przedtem pozostawały poza możliwościami badania klinicznego per rectum.

W odniesieniu do badań laboratoryjnych nasienia uzyskano wiele interesujących wyników wskazujących na rolę enzymów plemnikowych i tkankowych w środowisku pozaplemnikowym, które umożliwiają ocenę integralności błon plazmatycznych plemnika, a tym samym pozwalają wnioskować o jego biologicznej wartości, tak w nasieniu świeżym, jak też w procesie postępowania kwalifikacyjnego nasienia przeznaczonego do kriokonserwacji, przewidując równocześnie efektywność mrożeniową. Możliwości takie zostały wykazane w pracach Bittmar i Kosiniaka [7, 8, 9], którzy opracowali metody pozwalające na zastosowanie poziomu enzymów (AspAT, LDH, PA), zawartości białka całkowitego i antyoksydantów jako markerów w ocenie wartości nasienia ogiera, tak świeżego, jak też mrożonego, które po zastosowaniu do sztucznego unasieniania klaczy rokuje wysoką płodność.

Spośród badań o podłożu fizjologicznym za najważniejsze – ze względów utylitarnych – należy uznać te, które pozwoliły na ustalenie wieku, w którym ogier osiąga optymalną wydolność reprodukcyjną, co następuje między 5 a 7 rokiem życia. Na tej podstawie wskazano na konieczność ostrożnej i kontrolowanej eksploatacji młodych ogierów w okresie dwóch pierwszych sezonów ich reprodukcyjnego użytkowania [58, 62].

Biochemiczne badania osocza nasienia, a także badania struktur morfologicznych plemnika wskazały na istotne różnice rasowe i sezonowe, które powinny być brane pod uwagę w ocenie wartości reprodukcyjnej ogiera [59, 61, 62].

Do badań pomyślnie rokujących dalszym postęp w zakresie diagnostyki funkcji rozrodczych ogiera i wartości plemników należą prowadzone ostatnio prace poświęcone roli antyoksydantów w nasieniu ogiera, a także praktycznemu zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej w ocenie integralności błon plemnikowych.

Klacz

W badaniach nad rozrodem ssaków najważniejsze osiągnięcia ubiegłego wieku związane były z określeniem warunków zapłodnienia i produkcji zarodków poza ustrojem matki. Specyfika rozrodu klaczy, odmienność struktur anatomicznych i fizjologicznych powodowały, że postęp w badaniach osiągany był nieco później niż u samic innych gatunków zwierząt gospodarskich.

W każdym cyklu jajnikowym klaczy określona liczba pęcherzyków podejmuje wzrost i dojrzewanie, następnie większość z nich ulega atrezji, a nieliczne owulują. Płyn pęcherzykowy jest źródłem wielu hormonów i ciał biologicznie czynnych, które biorą udział w skomplikowanym mechanizmie regulacji na drodze endokrynnej, parakrynnej i autokrynnej [92]. Na przykład u kobiet hormony sterydowe zawarte w płynie pęcherzykowym jajników są uważane za główne markery dojrzewania pęcherzyków i oocytów. Morfologicznie niedojrzałe oocyty pochodzą głównie z pęcherzyków, które zawierają wyraźnie niższy poziom progesteronu, dihydrotestosteronu i androstendionu niż pęcherzyki z prawidłowymi morfologicznie oocytami [12]. Poziom inhibiny B w płynie pęcherzykowym jest głównym markerem prawidłowości rozwoju oocytów i zarodków w programach zapłodnienia in vitro u ludzi [19].

Stosunkowo nieliczne są badania dotyczące wskaźników wzrostu pęcherzyków i oocytów klaczy. Oceniając zależność pomiędzy stopniem atrezji pęcherzyków jajnikowych a zdolnością oocytów do dojrzewania in vitro wykazano, że atrezja komórek granulozy związana była ze zmniejszonym poziomem estrogenów w płynie pęcherzykowym, który wynosił 142,5 ± 51,4 ng · ml^{-1} i 20,1 ± 6,3 ng · ml^{-1} odpowiednio w pęcherzykach zdrowych i atretycznych. Wysoki poziom progesteronu można uważać za wskaźnik gotowości pęcherzyków do owulacji, a niski poziom androstendionu za jeden z możliwych wskaźników obniżonej jakości oocytów [89, 90].

Niektóre aspekty wzrostu pęcherzyków jajnikowych klaczy kontroluje dopamina [87]. Antagoniści dopaminy stymulują wzrost fali pęcherzykowej po zakończeniu anestrus, natomiast agoniści opóźniają rozwój pęcherzyków w okresie przejściowego anestrus [13]. Koncentracja dopaminy w płynie pęcherzykowym była odwrotnie proporcjonalna do średnicy pęcherzyków jajnikowych, przyjmując wartości 24,0 ± 6,7; 57,0 ± 57,0 i 8,0 ± 13,7 pg · ml^{-1} odpowiednio w pęcherzykach małych (<25 mm), średnich (26–35 mm) i dużych (>35 mm). Jednocześnie zbliżony poziom receptorów dopaminowych i FSH stwierdzono w części korowej jajników w fazie anestrus i w komórkach granulozy w okresie aktywności rozrodczej [5]. Szybszy wzrost pęcherzyków jajnikowych klaczy w okresie anestrus przejściowego niż głębokiego, związany był z ponad trzykrotnie większą koncentracją estradiolu i inhibiny B w fazie przejściowej. Poziom tych substancji może być zatem wskaźnikiem wzrostu pęcherzyków już w fazie anestrus [31].

Interesującym aspektem o charakterze poznawczym i aplikacyjnym są nowe badania dotyczące wykorzystania HCG do wywoływania owulacji. Preparat ten jest stosowany w kolejnych cyklach rujowych klaczy, pomimo doniesień o powstawaniu

przeciwciał, które obniżają jego efektywność [34]. Gastal i in. [37] wykazali, że HCG wstrzymuje wzrost co prowadzi do zmniejszenia średnicy pęcherzyków przedowulacyjnych. Powtarzalne podawanie HCG w kolejnych trzech cyklach rujowych nie obniżało efektywności owulacji.

Alternatywą HCG może być nowy rekombinat LH pochodzenia końskiego, który u 57% klaczy wywołuje owulację do 48 godz. po podaniu w zalecanej dawce 750 ng reLH [128]. Podobną skutecznością cechuje się Kisseptin – dekapeptyd, kontrolujący funkcje rozrodcze za pośrednictwem GnRH, LH i FSH, wcześniej opisany u szczurów i owiec. W badaniach u klaczy wykorzystano dekapeptyd pochodzenia ludzkiego [14].

Ważnym endokrynologicznie aspektem owulacji u klaczy jest rola płynu pęcherzykowego, który dostaje się do jamy otrzewnowej. Inhibina wydzielana przez komórki granulozy, odgrywa istotną rolę w kontroli FSH w czasie cyklu rujowego [88,104]. W następstwie owulacji płyn otrzewnowy zawiera wysoką koncentrację inhibiny, a zatem sekrecja FSH zależy od ilości płynu pęcherzykowego przedostającego się do jamy otrzewnowej [86].

Stosunkowo nowe są także badania dotyczące ekspresji genów związanych z powstawaniem i zanikiem ciałka żółtego. Wycinki ciałka żółtego pobierano przyżyciowo pod kontrolą USG. Stwierdzono, że ilości STAR (steroidogenic acute regulatory protein) i 3β HSD obniżają się pomiędzy 12 a 14 dniem cyklu [15].

Na przebieg cyklu rujowego samic może mieć również wpływ zanieczyszczenie środowiska. Zaburzenia różnego charakteru w rozrodzie loch i krów są efektem skarmiania pasz zawierających mykotoksyny. U klaczy karmionych owsem naturalnie zanieczyszczonym zearalenonem i deoxynivalenonem, nie wykazano różnic w poziomach progesteronu, estradiolu i LH, długości cyklu rujowego i obrazie histologicznym macicy. Stwierdzono tendencje do występowania większej liczby pęcherzyków w drugiej połowie cyklu jajnikowego. Możliwe zatem jest miejscowe oddziaływanie na jajniki i krzepliwość krwi, gdyż u klaczy doświadczalnych częściej występowały krwiaki pęcherzykowe i krwotoczne ciałka żółte [2, 49].

W mechanizmie rozpoznawania własnej ciąży przez organizm klaczy, ważną rolę odgrywają substancje wydzielane przez zarodki. W trakcie wędrówki przez jajowód produkują one PGE_2, która umożliwia otwarcie brodawki macicznej i przedostanie się zarodka do macicy [125]. Ten efekt został wykorzystany przez Allena i in. [1], którzy żel zawierający 0,2 mg PGE_2, rozprowadzili na powierzchni jajowodów techniką laparoskopową. W wyniku takiego traktowania przywrócono płodność u 14 z 15 klaczy jałowiejących prawdopodobnie na tle niedrożności jajowodów.

Produkcja zarodków w warunkach in vitro u klaczy jest zdecydowanie mniej zaawansowana niż u innych gatunków zwierząt. Metodą klasycznego zapłodnienia in vitro nie uzyskano ciąży poza przypadkami opisanymi przez grupę francuską [93]. Tym niemniej badania dotyczące oocytów są wciąż kontynuowane.

Zamrażanie oocytów jest metodą przechowywania materiału genetycznego samic do wykorzystania w przyszłości, przy zastosowaniu metod wspomaganego zapłodnienia. Dotychczasowe osiągnięcia dotyczące kompetencji rozwojowych oocytów po

rozmrożeniu są stosunkowo niewielkie. Procent oocytów klaczy zamrażanych w stadium pęcherzyka zarodkowego, które w hodowli in vitro uzyskują stadium MII (16–30%) jest znacznie niższy niż oocytów niemrożonych (50–80%). Z drugiej strony Maclellan i in. [81] donosili o urodzeniu 2 źrebiąt w następstwie wprowadzenia 26 uprzednio witryfikowanych w stadium MII oocytów do jajowodów inseminowanych klaczy. Witryfikacja wpływa zdecydowanie niekorzystnie na wrzeciono podziałowe i potencjał rozwojowy oocytów. W 48 godzinie po ICSI stwierdzono podziały 34% i 16% oocytów witryfikowanych w stadium GV i MII, a 48% dla grupy kontrolnej. Jednakże tylko 1 z 58 dzielących się oocytów witryfikowanych w stadium GV rozwinął się do blastocysty, a 21% z grupy kontrolnej niewitryfikowanej [114].

Na wyniki hodowli oocytów w warunkach in vitro może mieć wpływ wiek klaczy dawczyń. W ostatnim dwudziestoleciu ubiegłego wieku zapoczątkowano także prace nad skróceniem odstępu międzypokoleniowego u wielu gatunków zwierząt, poprzez wykorzystanie w technikach in vitro oocytów pozyskanych od niedojrzałych płciowo samic. Ciąże i potomstwo uzyskano po zapłodnieniu in vitro oocytów cieląt, jagniąt i koźląt. Badania dotyczące oocytów źrebiąt wskazują, że możliwe jest uzyskanie w warunkach in vitro stadium MII [84]. Brak jest doniesień na temat skutecznych prób zapłodnienia.

Płodność klaczy obniża się z wiekiem; jest to wynik zwiększonej zamieralności zarodkowej już na etapie przesuwania i rozwoju w jajowodzie [3]. Samo środowisko jajowodu usposabia do obumierania zarodków, ale istotniejszym problemem wydają się obniżone kompetencje rozwojowe oocytów klaczy starszych [18]. U kobiet zaburzenia chromosomów u płodów przypuszczalnie są główną przyczyną niemożności utrzymania ciąży w starszym wieku [126]. Nieprawidłowości chromosomów są często spotykane u koni we wczesnych blastocystach [102]. Powstawanie wrzeciona w trakcie podziałów mejotycznych i mitotycznych, jak i przemiany w chromosomach, są aktywnym procesem zależnym od energii generowanej przez mitochondria. Wykorzystując technikę PCR stwierdzono, że ilość kopii mitochondrialnych DNA uzyskanych z oocytów pochodzących od klaczy starszych (>12 lat) po hodowli in vitro była mniejsza niż uzyskana z oocytów klaczy młodych (<12 lat). Zmiany w mitochondriach klaczy starych potwierdzono obserwując je w mikroskopie elektronowym. Uszkodzenia mitochondriów są przypuszczalnie podstawową przyczyną wzrostu częstotliwości zaburzeń chromosomalnych zarodków samic w zaawansowanym wieku [102].

Wobec problemów z produkcją zarodków in vitro techniką klasycznej inseminacji oocytów plemnikami kapacytowanymi in vitro, metodą alternatywną staje się wspomagane zapłodnienie i mikroiniekcja plemnika do oocytu (ICSI). Próbuje się wykorzystać plemniki świeże, natychmiast po pobraniu lub po zamrożeniu i rozmrożeniu [20], a także plemniki najądrzowe [103].

Grupa brazylijska [43] w wyniku ICSI oocytów hodowanych in vitro uzyskała zbliżone wyniki podziałów po 48 godz.; 73,5%, 61–69%, 64–70%, gdy do mikroiniekcji wykorzystano odpowiednio plemniki bezpośrednio po pobraniu, po rozmro-

żeniu i plemniki najądrzowe po rozmrożeniu. Procent zarodków z większą niż osiem liczbą blastomerów ocenianych w 96-godzinnej hodowli nie różnił się istotnie w poszczególnych grupach (9,5–19%).

Choi i in. [21] do ICSI wykorzystywali także plemniki liofilizowane i po rozmrożeniu. Procent podziałów wynosił 33–100%, a blastocyst 27–30%. Jednakże w przypadku mikroiniekcji plemników liofilizowanych, aktywacja oocytów była dodatkowo wspomagana. Spośród 9 blastocyst wprowadzonych do macicy klaczy uzyskano 6 ciąż. Również produkcja zarodków koniowatych metodą klonowania somatycznego stwarza określone nadzieje. Jednak, podobnie jak u innych gatunków zwierząt, procent zamieralności zarodków uzyskanych na drodze klonowania sięga 75–86%. Barierą w opanowaniu tej techniki u koni jest także niski procent blastocyst powstałych z enukleowanych oocytów po wszczepieniu jąder komórek somatycznych (3–10%). Istotne zatem stają się badania nad opanowaniem i doskonaleniem technik aktywacji rekombinatów. Hinrichs i in. [44] używali ionomycyny uzyskując 3,4–12,5% blastocyst, gdy fibroblasty przed iniekcją do oocytów były inkubowane z roscovitiną (15 $\mu g \cdot ml^{-1}$ przez 24 godz.). Roscovityna wywołuje odwracalny blok mejozy, wpływa korzystnie na ich potencjał rozwojowy i wyniki zapłodnienia in vitro. Z 13 blastocyst przeszczepionych do klaczy biorczyń u 9 (69%) stwierdzono ciąże. Dwie z nich poroniły w 6 i 10 miesiącu. Zmian u płodów w trakcie sekcji nie stwierdzono.

Ważnym zatem aspektem badań nad klonowaniem jest aktywacja oocytów. Ma ona na celu zainicjowanie zmian, które mają miejsce po wniknięciu plemnika do komórki jajowej. W efekcie następuje zmiana wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów wapnia, inaktywacja MPF (maturating promotor factor), co umożliwia podział mejotyczny oocytu, a następnie rozwój zarodkowy [78].

Carnerio i in. [17] do partenogenetycznej aktywacji oocytów klaczy wykorzystywali ionomycynę, dwumetyloaminopurynę (6-DMAP), timerosal, chlorek strontu, i stwierdzili podziały (20–38%), które w większości kończyły się na etapie dwukomórkowym. Tylko w jednym z badanych wariantów (ionomycyna i 6-DMAP) uzyskano stadium moruli (16%).

W ostatnich latach ważnym aspektem badań są prace o charakterze podstawowym i aplikacyjnym, dotyczące programowania płci potomstwa. Różnice w ilości DNA między plemnikami X i Y umożliwiły skuteczny rozdział plemników w cytometrze przepływowym [48]. Zastosowanie sortowanych plemników w technikach sztucznej inseminacji i zapłodnienia pozaustrojowego pozwoliło na uzyskanie potomstwa o zaplanowanej płci u królików, owiec, bydła, a także koni [16]. Problemem pozostaje zbyt niska, jak na potrzeby standardowej inseminacji, szybkość sortowania (obecnie 3–5 tys. plemników na sekundę) i niższa zdolność zapładniająca sortowanego nasienia.

Różnica zawartości DNA między plemnikami X i Y, wynosząca u koni około 3,7%, pozwoliła na uzyskanie potomstwa o żądanej płci, z czystością przekraczającą 90% [75]. Szersze zastosowanie tej metody w hodowli koni wciąż wymaga roz-

wiązania problemów. Jednym z nich jest wielkość dawki plemników stosowanej przy inseminacji klaczy wynosząca 100–500 × 10^6 plemników. Uzyskanie takiej liczby sortowanych plemników praktycznie jest niemożliwe, stąd poszukiwanie metod unasieniania, które zapewniłyby skuteczność przy znacznej redukcji ilości plemników.

Linsdey i in. [76] dawkę inseminacyjną zawierająca 5 × 10^6 plemników wprowadzali za pomocą endoskopu domacicznie w okolice brodawki. Uzyskano 40%, 37,5%, 37,5% i 13,5% ciąż, odpowiednio przy stosowaniu nasienia świeżego, świeżego sortowanego, mrożonego i sortowanego mrożonego.

Z kolei McCue i in. [83] uzyskali zapłodnienie i ciąże wprowadzając metodą chirurgiczną 2 × 10^5 plemników bezpośrednio do jajowodów. Wydaje się, że ta metoda nie ma szans praktycznego zastosowania ze względu na problemy techniczne i wysokie koszty. Precyzyjne umieszczenie nasienia przy ujściu brodawki macicznej umożliwia zastosowanie wideoendoskopu. Istnieje także możliwość głębokiej domacicznej inseminacji pod kontrolą rektalną [77]. Uzyskane wyniki są zróżnicowane. Buchanan i in. [16], stosując dawkę 25 × 10^6 sortowanych plemników, uzyskali 40% ciąż. Z kolei Lindsey i in. [75] po zastosowaniu 5 × 10^6 prawidłowych sortowanych plemników na 10 inseminacji nie uzyskali zaźrebień. Stosowane do inseminacji dawki nasienia różnią się znacznie między sobą, od 20 ml w przypadku nasienia świeżego, 0,5–8 ml mrożonego oraz 0,2–0,5 ml po sortowaniu i mrożeniu. Być może ten aspekt należy uwzględnić w przyszłych badaniach. Wydaje się, że regulacja płci koni z zastosowaniem sortowanego nasienia wymaga dalszych prac dotyczących postępowania z nasieniem i technik inseminacji [10].

Badania dotyczące rozrodu klaczy prowadzone w polskich placówkach weterynaryjnych, skupiały się głównie na zagadnieniach patologii rozrodu oraz stanu zdrowotności macicy i zaburzeń płodności [4, 5, 74]. Ciekawym problemem podjętym przez naukowców z Olsztyna jest monitorowanie procesów rozrodczych u zwierząt na podstawie oceny poziomu estrogenów i gestagenów [108]. Pozostałe prace dotyczyły wybranych aspektów ciąży i okresu okołoporodowego [40, 116, 127].

Niniejszy artykuł jest przeglądem istotnych, z punktu widzenia autorów, problemów z zakresu rozrodu klaczy. Duża część tych zagadnień była tematem doniesień prezentowanych na IX Sympozjum Rozrodu Koni, które odbyło się w dniach 6–11 sierpnia 2006 r. w Holandii. Należy podkreślić, że odbywające się co 4 lata sympozja dają najpełniejszy przegląd aktualnych problemów badawczych realizowanych w liczących się placówkach na świecie. Ponadto co 2 lata w Europie odbywają się sesje naukowe EEGG (European Equine Gamete Group), ostatnio z udziałem naukowców z USA, na temat gamet ogierów i klaczy. Do publikacji zawartych w tych materiałach odsyłam zatem czytelników pragnących poznać szersze spektrum badań prowadzonych nad rozrodem koni, zapłodnieniem klaczy nieźrebnych, wczesnym rozwojem zarodkowym, klaczą źrebną i okresem neonatalnym.

Literatura

[1] Allen W.R., Wilsher S., Morris L., Crowhurst J.S., Hillyer M.H., Neal H.N. 2006. Re-establishment of oviductal potency and fertility in infertile mares. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 242–243.

[2] Aurich J.E., Hoppen H.O., Trampler R., Zentek J., Boehm J., Razzazi-Fazeli E., Aurich C. 2006. Effects od mycotoxins on reproductive function in mares. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 238–241.

[3] Ball B.A., Little T.V., Weber J.A., Woods G.I. 1989. Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *J. Reprod. Fert*. 85: 187–194.

[4] Barański W., Raś A., Janowski T. 2003. Aktualne poglądy na przyczyny i leczenie zatrzymania łożyska u klaczy. *Medycyna Wet*. 59(10): 857–860.

[5] Barański W., Skolimowska A., Mełecki Tepicht J., Janowski T. 2002. Antybiotykooporność flory bakteryjnej macicy klaczy w rui źrebięcej. *Medycyna Wet.* 58(12): 963–965.

[6] Bartosz G. 1995. Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa.

[7] Bittmar A., Kosiniak K. 1991. Aktywność AspAT jako test prognozujący o przydatności nasienia ogiera do głębokiego zamrażania. Mat. Symp. „Rozród Koni" Kraków: 102–104.

[8] Bittmar A., Kosiniak K. 1991. The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitablility for deep-freezing. *Pol. Arch. Vet*. 32: 17–29.

[9] Bittmar A., Kosiniak K., Podstawski Z. 1992. Association between stallion age sperm concetration and semen freezability. Mat. Kongr., Haga, XII Int. Cong. on Animal Reprod. Vol. 3: 1393–1395.

[10] Bochenek M., Herjan T., Okólski A., Smorąg Z. 2005. Sperm chromatin abnormalities after semen sexing procedure – preliminary results. *Proc. Int. Equine Gamete Group, Havemayer Foundation*, Mon. Ser. 18: 13–14.

[11] Borg K., Colenbrander B., Fazeli A., Parlevliet J., Malmgren L. 1997. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 48(4): 531–536

[12] Botero-Ruiz W., Laufer N., DeCherney AH., Polan M., Halsentine F.,Behrman H. 1984. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil. Steril*. 41: 820–826.

[13] Brendemuehl J.P. Cross D.L. 2000. Influence of dopamine antagonist domperidone on the vernal transition in seasonally anoestrus mares. *J. Reprod. Fertil.* Suppl. 56: 185–193.

[14] Briant C., Schneider J., Guillaume D., Ottogalli M., Duchamp G., Bruneau B., Caraty A. 2006. Kisseptin induces ovulation in cycling Welsh pony mares. 2006. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 217–219.

[15] Bruemmer J.E., Slough T., Carnevale E.M, Niswender G.D. 2006. Temporal in vivo gene expression in the developing and regressing equine corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 94: 226–227.

[16] Buchanan B.R., Seidel GE.., Jr., McCue P.M., Schenk J.L., Herickhoff L.A., Squires E.L. 2000. Insemination of mares with low numbers of either or sexed spermatozoa. *Theriogenology* 53: 1333–1344.

[17] Carneiro G.F., Lorenzo P.L., Pereira G.R., Pegoraro L., Pimentel C.A., Liu I.K.M. 2006. Artificial activation of in vitro-matured equine oocytes with strontium chloride, thimerosal, and calcium ionophore. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 311–313.

[18] Carnevale E.M., Ginther O.J. 1995. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono*. 1: 209–214.

[19] Chang C.,Wang T.H., Horng S.G, Wu H.N, Wang H.S., Soong Y.K. 2002. The concentration of inhibin-B in follicular fluid: relation to oocyte maturation and embryo development. *Hum. Reprod*. 17: 1724–1728.

[20] Choi Y.H., Love C.C., Love L.B., Varner D.D., Brinsko S.P., Hinrichs K. 2002. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed sperm. *Reproduction* 123: 455–465.

[21] Choi Y.H., Varner D.D., Hartman D.L., Hinrichs K. 2006. Blastocyst production from equine oocytes fertilized by intracytoplasmatic injection of lyophilized sperm. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 307–308.

[22] Colenbrander B., Gadella B. M., Stout T. A. 2003. The predictive value of semen analysis in the evauation of stallion fertility. Reprod Domest Anim. Review: 305–311.

[23] Danek J. 2003. Effect of *Escherichia coli* endotoxin on the levels of testosterone and estradiol-17β in blood serum and seminal plasma and on the semen characteristics in the stallion. *Bull. Vet. Inst.* Pulawy 47: 191–201.

[24] Danek J. 2005. Wpływ deksometazonu i fluniksyny na wskaźniki krwi u ogiera. *Med. Wet*. 31: 1395–1399.

[25] Danek J. 2006. Wpływ lipopolisacharydu i fluniksyny na stężenie steroidów płciowych i biochemiczne wskaźniki nasienia ogierów. *Med. Wet*. 62: 713–716.

[26] Danek J., Gehrke M. 1997. Zur Zinkkonzentration im Samenplasma von Hengsten. Mengen-und Spurenelemente. 17. Arbeitstagung, Friedrich-Schiller-Universität Jena: 251–260.

[27] Danek J., Wiśniewski E. 1992. Wpływ niedoboru cynku w diecie na wskaźniki ematologiczne, aktywność fosfatazy zasadowej i stężenie białka całkowitego w surowicy oraz na zawartość cynku, miedzi i wapnia w surowicy i sierści ogierów. *Med. Wet*. 48: 521–523.

[28] Danek J., Wiśniewski E. 1992. Zmiany jakości nasienia w niedoborze cynku u ogierów. *Med. Wet*. 48: 566–568.

[29] Danek J., Wiśniewski E., Krumrych W. 1996. Zmiany stężenia cynku, miedzi i żelaza w surowicy krwi i osoczu nasienia ogierów w sezonie kopulacyjnym. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol*. 434: 759–768.

[30] Danek J., Wiśniewski E., Krumrych W. 1999. Korelacje między stężeniem cynku, miedzi i wapnia w surowicy krwi a cechami nasienia ogierów. *Med. Wet.* 55: 259–264.

[31] Donadeu F.X. 2006. Early indicators of follicular growth during the anovulatory season in mares. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 179–181.

[32] Dowseet K. F., Pattie W. A. 1982. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert.* Suppl. 32: 1–8.

[33] Dowsett K. F., Knott L. M. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46: 397–412.

[34] Duchamp G., Bour B., Combarnous Y., Palmer E. 1987. Alternative solution to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fertil.* Suppl. 35: 221–228.

[35] Estrada A., Samper J. C., Lillich J. D., Rathi R. R., Brault L. S., Albrecht B. B., Imel M. M., Senne S. 2003. Azoospermia associated with bilateral segmental aplasia of the ductus deferen. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 222(12): 1740–1742.

[36] Fraser L., Lecewicz M., Strzeżek J. 2002. Fluorometric assessments of viability and mitondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol. J. Vet. Sci*. 5(2): 85–92.

[37] Gastal E.L., Silva L.A., Gastal M.O., Evans M.J. 2006. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 186–190.

[38] Glogowski J. 1988. Fosfataza alkaliczna układu rozrodczego knura. *Zesz. Nauk. ART* 31, Suppl. B: 1–53.

[39] Glogowski J., Strzeżek J. 1979. Fosfataza alkaliczna – niektóre właściwości i funkcja w żeńskim i męskim układzie rozrodczym. *Med. Vet.* 1: 34–38.

[40] Graffstein J., Niezgoda J. 2006. Plasma arginine-vasopressin in mares around parturition and in their foals during first week of life. *Anim. Reprod*. 94: 420–423.

[41] Graham J.K. 1996. Analysis of stallion semen and its relatin to fertility. *Vet. Clin. North Am. Eqiune Pract*. Apr. 12(1) Review: 119–130.

[42] Graham J. K. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*. Apr. 12(1): 131–147.

[43] Herrera C., Miragaya H.M., Conde P., Hynes V., Losinno L., Quintans C., Pasqualini R.S. 2006. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 299–302.

[44] Hinrichs K., Choi Y.H., Varner D.D., Hartman D.D. 2006. Efficient production of cloned horse pregnancies using roscovitine-treated donor cells. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 309–310.

[45] Hyland J., Church S. 1995. The use of ultrasonography in the diagnosis and treatment of a haematoma in the corpus cavernosum penis of a stallion. *Aust. Vet. J*. 72(12): 468–469.

[46] Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions; 66 cases (1987–1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197: 381–394.

[47] Jasko D. J., Little T. V., Lein D. H., Forte R. H. 1992. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristices with fertility in stallions; 64 cases (1987–1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 200: 979–985.

[48] Johnson L.A., Flook J.P., Look M.V. 1987. Flow cytometry of X and Y chromosome bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res*. 17: 203–212.

[49] Juchasz J., Nagy P., Kulcsar M., Szigeti G., Reiczigel L., Huszenicza G. 2001. Effect of low dose zearalenone exposure on luteal function, follicular activity and uterine oedema in cycling mares. *Acta Vet. Hung*. 49: 211–222.

[50] Kareskoski A.M., Reilas T, Andersson M, Katila T. 2006. Motility and plasma membrane intergrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reprod. Domest. Anim*. Feb. 41(1): 33–38.

[51] Kenney R.M., Bergman R.V., Cooper W.L., Mores G.W. 1975. Minimal contamination technigues for breeding mores: techniques and preliminary findings. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* 21: 327–336.

[52] King S.S., Jones K.L., Mullenix B.A. , Heath D.T., Everson K.A., Arbogasst L.A. 2006. Evidence for dopaminergic activity in equine follicles and ovarian germinal epithelium. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 175–178.

[53] Klinic P., Kosec M., Majdic G. 2005. Frezability of equine semen after glass beads column separation. *Equine Vet. J.* Jan. 37(1): 43–47.

[54] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z., Romanowska K. 2003. Ocena zamrażalności nasienia 5-, 6- i 7-letnich ogierów. *Rocz. Nauk. Zoot*., Supl. 18: 25–28.

[55] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z., Gorazd M. 2003. The results of stallions reproductive examinations in National Studs in Poland. *Naukowij Wisnik*. Lwów. 5: 178–178.

[56] Kosiniak-Kamysz K., Podstawski Z., Bittmar A., Gorazd M. 2003. Rasowe i sezonowe uwarunkowania zamrażalności nasienia ogiera. *Rocz. Nauk. Zoot*., Supl. 18: 21–24.

[57] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z., Gorazd M., Pieszka M. 2003. Stallions qualification for reproduction after thier examinations in training centers. *Naukowij Wisnik*. Lwów. 5: 178–180.

[58] Kosiniak K. 1983. Ocena przydatności rozrodowej ogierów. *Koń Polski* 3(71): 4–6.

[59] Kosiniak K., Bittmar A. 1987. Analysis of the psysiological processes connected with sexual maturation of stallions. *Pol. Arch. Wet*. 27(1): 5–21.

[60] Kosiniak K., Bittmar A. 1991. Prognosis of stallion semen freezability on the basic of biochemical tests. *J. Repr. Fert*. Suppl. 44: 653–654.

[61] Kosiniak-Kamysz K. 2002. Biologiczne uwarunkowania wartości rozrodowej ogierów. Mat. Konf. Nauk. „Nowe trendy w organizacji hodowli i rozrodu koni w Polsce", Kraków: 18–30.

[62] Kosiniak-Kamysz K. 2000. Problematyka dojrzewania płciowego i użytkowania rozrodowego ogierów. Mat. Konf. Nauk. „Uwarunkowania środowiskowe rozrodu samców zwierząt gospodarskich". Kraków-Balice: 47–76.

[63] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z., Gorazd M. 2005. Characteristics of the breed structure and semen quality of stallions from National Stallion Depots. 8th Inter Symp. Modern Trends in Livestock Production Belgrad. *Biotechnoligy in Animal Husbandry* 21(5–6): 73–75.

[64] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Gorazd M., Podstawski Z. 2004. Breed and seasonal differences in stallion semen morphological examination. Naukowij Wisnik Lwów 6(2) część 4: 190–193.

[65] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z. 1997. Różnice rasowe w ocenie przydatności nasienia ogierów do mrożenia. *Zesz. Nauk. AR Szczecin* 177. *Zootech*. 35: 251–257.

[66] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z. 2000. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej w osoczu nasienia ogiera. *Przegl. Hod. Zesz. Nauk. PTZ* 50: 325–332.

[67] Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z. 2000. The influence of aspartate aminotransferase activity and sperm morphology on stallion and dog semen freezability. *Naukovij Visnik Naciolalnogo Agrarnego Universitetu Kijev* 22: 140–144.

[68] Kosiniak-Kamysz K., Gorazd M., Bittmar A., Podstawski Z. 2004. Relationship between antioxidants level, semen quality and biochemical components in stallion semen. *Naukowij Wisnik* Lwów 6(2) część 2: 173–176.

[69] Kosiniak-Kamysz K., Gorazd M., Podstawski Z., Bittmar A. 2005. Comparative analysis between alkaline phosphatase activity and other components in stallion semen. The 4 th Symposium of the Society for Biology of Reproduction and Polish- Japanese Seminar Book of Abstracts, Session VII, Kraków: 160.

[70] Kosiniak-Kamysz K., Podstawski Z., Bittmar A. 1999. Ocena przydatności schłodzonego i mrożonego nasienia ogiera do AI klaczy. Mat. Międzynar. Symp. „Aktualne kierunki hodowli i użytkowania koni w Europie" Kraków: 427–432.

[71] Kosiniak-Kamysz K., Podstawski Z., Bittmar A. 2000. The effective methods of stallion semen qulification for deep feezing. *Naukowij Wisnik Nacionalnogo Argarnogo Uniwersytetu. Kijów*. 22: 133–140.

[72] Kuisma P., Andersson M., Koskinen E., Katila T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory mehods. *Acta Vet. Scand.* 17; 48(1): 14.

[73] Kuklińska M., Gorazd M., Nowacka A., Kosiniak Kamysz K., Strzeżek J. 2005. Antioxidant system of boar and stallion seminal plasma – comparative studies. The 4 th Symp. of the Society for Biology of Reprod. and Polish–Japanese Seminar Book of Abstracts, Session VII, Kraków: 143.

[74] Kusy R. Wawron W. 2006. Aktywność płciowa klaczy czystej krwi arabskiej z endometriosis w sezonie zimowym. *Medycyna Wet.* 62(2): 207–211.

[75] Lindsey A.C, Morris L.H.A., Allen W.R., Schenk J.L., Squires E.L., Bruemmer J.E. 2002. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Vet. J*. 34: 128–132.

[76] Lindsey A.C., Bruemmer J.E., Squires E.L. 2001. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Anim. Reprod. Sci*. 68: 279–289.

[77] Lindsey A.C., Varner D.D., Seidel G.E.Jr., Bruemmer J.E., Squires E.L. 2002. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18h at either 5 or 15°C prior to flow-cytometric sorting. *Theriogenology* 58: 659–662.

[78] Liu L., Ju J.C., Yang X. 1998. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod*. 59: 537–545.

[79] Love C.C. 1992. Ultrasonographic evalution of the testis, epididymis, and spermatic cord of the stallion. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* Apr; 8(1): 167–182.

[80] Luberda Z., Strzeżek J. 1990. Wybrane aspekty peroksydacji lipidów w nasieniu. *Post. Nauk Rol*. 4/5/6: 95–106.

[81] Maclellan L.J., Carnevale E.M., Coutinho da Silva M.A., Scoggin C.F., Bruemmer J.E., Squires E.I. 2002. Pregnancies from vitrified equine oocyte collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 58: 911–919.

[82] Malmagren L., Sussemilch B. I. 1992. Ultrasonography as a diagnostic tool in a stallion with seminal vesiculitis. A case Report. *Theriogenelogy* Apr; 37(4): 935–938.

[83] McCue P.M., Fleury J.J., Denniston D.J., Graham J.K., Squires E.L. 2000. Oviductal insemination of mares. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 56: 499–502.

[84] Młodawska W., Kaniowska D. Tischner M.: 2004. Morphology of ovaries and in vitro maturation of filly oocyte-cumulus complexes. *Proc. Int. Equine Gamete Group, Havemayer Foundation*, Mon. Ser. 13: 13–16.

[85] Muller Z. 1982. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J. Reprod. Fert.* Suppl. 35: 121–125.

[86] Nambo Y., Hasegawa T., Sato F., Oki H., Kusunose R., Nakai R., Nagata S., Watanabe G., Taya K. 2002. The release of follicular fluid into the peritoneal cavity during ovulation in mares. *Theriogenology* 58: 545–548.

[87] Nequin L.G., King S.S. 1988. A dopaminergic neural system inhibits ovarian function during anestrus in the mare. *Biol. Reprod*. 38 (Suppl.1), 114 (Abstract 197).

[88] Nogamine N., Nambo Y., Nagata S., Nagaoka K., Tsunoda N., Taniyama H., Tanaka Y., Tohei A., Watanabe G., Taya K. 1998. Inhibin secretion in the mare: localization of inhibin α, β_A and β_B subunits in the ovary. *Biol. Reprod*. 59: 1392–1398.

[89] Okólski A., Bezard J., Duchamp G., Driancourt M., Goudet G., Palmer E. 1995. Succesissive puncture of the dominant follicle followed by ovulation and fertilization: A new experimental model for the study of follicular maturation in the mare. *Biol. Reprod. Mono* 1: 393–401.

[90] Okólski A., Bezard J., Magistrini M., Pallmer E. 1991. Maturation of oocytes from normal and atretic equine ovarian follicles as affected by steroid concentrations. *J. Reprod. Fertil.* Suppl. 44: 385–392.

[91] Pace M.M., Sullivan J.J. 1975. Effect of timing of insemination numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J. Reprod. Fert*., Suppl. 23: 115–121.

[92] Pallicer A., Diamond M.P., DeCherney A.,H., Naftolin F. 1987. Intraovarian markers of follicular and oocyte maturation. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.* 405: 217.

[93] Palmer E., Bezard J. Magistrini M., Duchamp G. 1991. In vitro fertilization in the horse: a retrospective study. *J. Reprod. Fertil*. Suppl. 44: 375–384.

[94] Podstawski Z., Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A. 2003. Charakterystyka frakcji ejakulatu ogiera pod kątem ich przydatności do zamrażania *Rocz. Nauk. Zoot*. Supl.18: 37–40.

[95] Podstawski Z., Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Piszczek A. 2003. Ocena laboratoryjna młodych ogierów. *Rocz. Nauk. Zoot*., Supl. 18: 17–20.

[96] Podstawski Z., Bittmar A., Kosiniak-Kamysz K. 2004. The application of stallion semen filtration method for semen qualification for freezing. *Naukowij Wisnik*. Lwów. 6(2) część 5: 82–85.

[97] Podstawski Z., Kosiniak K. 1994. Ocena wartości nasienia ogierów huculskich w odniesieniu do innych ras. Międzynar. Symp. „Prace nad zachowaniem rzadkich ras zwierząt gospodarskich". Balice: 92–93.

[98] Podstawski Z., Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A. 1998. Badania nad sposobami kwalifikacji nasienia ogiera do głębokiego zamrażania. Symp. Nauk. „Nauka w Polskiej Zootechnice XXI wieku" Lublin: 261–262.

[99] Podstawski Z., Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A. 1995. Charakterystyka wartości nasienia ogierów rasy śląskiej na tle innych ras. Międzynar. Konf. „Perspektywy hodowli regionalnych ras koni – konie rasy śląskiej". Wrocław: 53–57.

[100] Pozor M.A., McDonnell S.M. 2004. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*, Apr 1: 61(5): 799–810.

[101] Rambags B.P.B., Boxtel D.C.J., Tharasanit T., Lenstra J.A., Colenbrander B., Stout T.A.E. 2006. Maturation in vitro leads to mitochondrial degeneration in oocytes recevered from aged but not young mares. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 359–361.

[102] Rambags B.P.B., Krijtenburg P.J., Drie H.F., Lazzari G., Galli C., Pearson P.L., Colenbrander B., Stout T.A.E. 2005. Numerical chromosomal abnormalities in equine embryos produced in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev*. 72: 77–87.

[103] Rosati I., Bebbere D., Leoni G., Pintus P.P., Succu S., Ledda S., Naitana S. 2004. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured (IVM) equine oocytes with frozen/thawed epididymal spermatozoa. W: Proc. 15th Int. Congr. Anim. Reprod., Porto Seguro, Brazil (Abstract).

[104] Roser J.F., McCue P.M., Hoya Y. 1994. Inhibin activity in the mare and stallion. *Dom. Anim. Endocrinol*. 11: 87–100.

[105] Samper J.C., Crabo B.G. 1988. Filtration of capacitated stallion spermatozoa through filters containing glass wool and/or Sephadex. Proc 11th Int. Congr. Anim. Reprod. & Al., Dublin: 295.

[106] Samper J.C., Hellander J.C., Crabo B.G. 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality *J. Reprod. Fert.* Suppl. 44: 107–114.

[107] Shore M.D., Macpherson M.L., Combes G.B., Varner D.D., Blanchard T.L. 1998. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. *Theriogenology* Ocet; 50(5): 693–698.

[108] Skolimowska A., Małecki-Tepicht J., Janowski T. 2003. Określanie poziomu estrogenów i gestagenów w kale jako alternatywna metoda monitorowania procesów rozrodczych u zwierząt. *Medycyna Wet*. 59(3): 204–207.

[109] Strzeżek J., Łapkiewicz S., Lecewicz M. 1999. A note on antioxidants capacity of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Pap. Rep*. 17(4): 181–188.

[110] Strzeżek J., Kosiniak-Kamysz K., Bittmar A., Podstawski Z., Kuklińska M., Rafalski G. 2000. Antioxidants of seminal plasma in fertile stallion. XVIITH Inter. Conf. on Reprod.of Farm Animals. Proc. Book. Liptovsky Jan: 208–211.

[111] Strzeżek J., Kosiniak-Kamysz K., Kuklińska M., Bittmar A., Podstawski Z., Rafalski G. 2000. Enzymatic and non-enzymatic in stallion and boar semen. 4th Conf. ESDAR Newsletter. Prague 5: 56.

[112] Strzeżek J., Świdorowicz K. 1986. Kryobiochemische Veranderungen an Spermien und deren Befruchtungskapazitat. *Zuchthyg* 21: 64–70.

[113] Szczygieł M., Kurpisz M. 1999. Przydatność oceny morfologii plemników do oznaczania stanu płodności mężczyzny, określanego w warunkach in vitro. *Gin. Pol*. 70(1): 26–32.

[114] Tharasanit T., Colleoni S., Lazzari G., Colenbrander B., Galli C., Stout T. 2006. Developmental competence of equine oocytes vitrified at different stages of maturation. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 291–293.

[115] Tischner M. 2006. Biotechnologia w rozrodzie koni. *Życie Wet*. 81(1): 19–31.

[116] Tischner M.Jr., Niezgoda J. Tischner M. 2006. Intensity of stress reaction in the mare during transportation at different stages of ovarian activity and pregnancy. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 234–237.

[117] Turner R.M. 1996. Alkaline phosphatase activity in stallions semen and clinical implication. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract*. 42: 284–293.

[118] Turner R.M., Mc Donnell S.M. 2003. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology* 60(1): 1–10.

[119] Udała J., Boryczko Z., Ostrowska A., Udała J., Boryczko Z., Ostrowska A. 1992. Ocena sezonowych zmian jakości nasienia ogierów. *Zesz. Nauk AR. Szczecin* 151: 131–137.

[120] Verner D.D., Blanchard T.L., Brinsko S.P., Love C.C., Tylor T.S., Johnson L. 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Anim Reprod. Sci*. Jul 2(60–61). Review.: 493–509.

[121] Von Witze K.F. 1976. Glutamat-Oxalaceat-Transaminase-Activitat im Seminalplasma verschiedener Hautstierarten in Abhangigkeit von ph-Wert und von der Aspartatkonzentration. *Zuchthyg*. 11: 97–104.

[122] Wawron W. 2001. Występowanie i leczenie poporodowych zapaleń macicy u klaczy. *Medycyna Wet*. 57(4): 242–245.

[123] Weber J.A., Woods G.L. 1992. Transrecatal ultrasonography for the evalution of stallion accessory sex glands. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract*. 8(1): 183–190.

[124] Weber J.A., Woods G.L. 1993. Ultrasonographic measurement of stallion accessory sex glands and excurrent ducts during seminal emission and ejaculation. *Biol. Reprod*. 49(2): 267–273.

[125] Weber J.A., Freeman D.A., Vanderwall D.K., Woods G.L. 1991. Prostaglandin E_2 secretion by oviductal transport stage equine embryos. *Biol. Reprod*. 45: 540–543.

[126] Wilton L. 2002. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review. *Prenat. Diagn*. 22: 512–518.

[127] Witkowski W., Tischner M. 2000. Effect of increased day light during late pregnancy on the reproductive performance of mares after parturiton. *J. Reprod. Fert*. Suppl. 56: 673–677.

[128] Yoon M.J., Boime I., Colgin M., Niswender K.D., King S.S., Alvarenga M., Roser J.F. 2006. Single-chain recombinant eLH: Induction of ovulation in mares. *Anim. Reprod. Sci*. 94: 215–216.

Recent scientific and practical achievements in horse reproduction

Key words: reproduction, stallion, semen conservation, biochemical tests, mare, ovarian follicle, oocyte, assisted fertilization

Summary

An important progress in research work concerning horse reproduction was observed during last twenty years, however it is necessary to emphasize the important role of the research performed formerly in this area.

The extremely important scientific and practical aspect is to establish stallion biological quality on the basis of clinical examination of reproductive organs and laboratory examination of the semen.

The significant progress is observed in clinical stallion examination owing to utilization of USG what allows to detect both testes, epididymides and especially the accessory sex glands functions.

On the basis of performed observation it was found that the stallions reached the optimal reproductive ability between 5–7 years of age, however their earlier use needs to be under control because of considerable individual differences observed in this respect.

Besides of the stallion age, also the breed and seasonal differences affect the semen quality and stallion reproductive performance.

On the basis of observations it was possible to establish an important role of many semen plasma components, especially enzymes (AspAT, LDH, PA), as well as total protein and antioxidants in semen quality.

The levels of these components can be used for semen quality examination and prediction of its ability for deep freezing and use for mare artificial insemination.

Many papers dealing with the mare reproduction were concerned on follicular fluid as the sources of active biological substances which take part in regulatory process by different endocrine, paracrine, autocrine mechanisms. Some of them are important markers of follicular growth and oocyte quality. Progress in research on the assisted reproductive technique in equine reproduction is smaller than in other species. After in vitro fertilization the only foal that was born is the one obtained by French group in 1991. Recently vitrification has been used to cryopreserve mares oocytes.

Pregnancies have been obtained from intracytoplasmic sperm injection into oocyte matured in vitro as well as after transfer of donor fibroblast into enucleated oocytes. Finally sex sorted sperm with highly reduced number of spermatozoa was used to successfully inseminate the mares. The development of assisted reproduction techniques for horses still remains a challenge.

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 65–94

Postęp w badaniach dotyczących procesów rozrodczych u świń

***Stanisław Okrasa*[1]*, Jerzy Strzeżek*[2]**

[1] *Katedra Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn*

[2] *Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 1A, 10-718 Olsztyn*

Słowa kluczowe: rozród świń, oś podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowa, endokrynologia rozrodu, nasienie knura, proteomika nasienia, kriobiologia nasienia

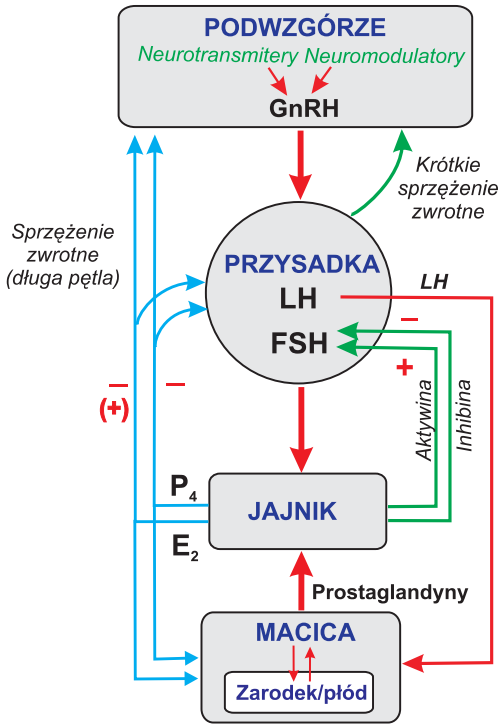
W latach siedemdziesiątych kilka zespołów w kraju podjęło tematykę badawczą dotyczącą procesów rozrodczych u świń. W ówczesnym Instytucie Fizjologii i Biochemii Zwierząt ART w Olsztynie dwa zespoły w Zakładzie Fizjologii Zwierząt – pod kierunkiem T. Krzymowskiego i H. Krzymowskiej – rozpoczęły badania nad regulacją procesów rozrodczych u samic, a w Zakładzie Biochemii Zwierząt jeden zespół – pod kierunkiem J. Strzeżka – rozpoczął badania z zakresu biochemii nasienia, które początkowo dotyczyły buhajów i tryków, a następnie knurów. Równocześnie zespół S. Stokłosowej z Instytutu Zoologii UJ w Krakowie coraz częściej do prowadzonych badań in vitro używał komórek jajnika świni. Wkrótce metody in vitro zostały zaadaptowane przez zespół J. Przała w placówce olsztyńskiej. Przypomnienie tych faktów wynika z ich znaczenia dla rozwoju badań procesów rozrodczych u świń w Polsce. W opracowaniu tym zostanie w skrócie przedstawiony postęp w zakresie badań podstawowych dotyczących rozrodu świń ze szczególnym uwzględnieniem osiągnięć krajowych.

Regulacja procesów rozrodczych u samic

Procesy rozrodcze są pod kontrolą osi neurohormonalnej, podwzgórze-przysadka-gonady, która u samic ssaków swoim oddziaływaniem obejmuje także macicę – miejsce rozwoju najpierw zarodka, a nastepnie płodu. W opracowaniu tym rozpatrzone będą poszczególne piętra osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej oraz macica. Ogólne zależności pomiędzy tymi strukturami przedstawiono na rysunku 1.

Podwzgórze

U świń, podobnie jak u samic innych gatunków ssaków, gonadoliberyna – GnRH (LHRH) – pełni kluczową rolę w regulacji aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej [23, 34, 35, 82, 225]. Izolacji GnRH – peptydu składającego się z 10 aminokwasów – z podwzgórza świni, dokonano w roku 1971, jednocześnie określając jego sekwencję aminokwasową [121, 144]. Lokalizacja neuronów wytwarzających GnRH w mózgowiu świni została opisana przez Polkowską i in. w roku 1985 [134]. W badaniach Kineman i in. [81] znaczną część ogólnej liczby neuronów GnRH-ergicznych stwierdzono w obszarze przedwzrokowo-przyśrodkowym (ok. 45%), paśmie przekątnym Broca (6,7%), przedniej (14,8%) i brzuszno-przyśrodkowej (18,6%) części podwzgórza, jądrze nadwzrokowym (7,1%) oraz strefie okołokomorowej (7,0%). Największe skupienie aksonów GnRH-ergicznych odnotowano po stronie bocznej wyniosłości przyśrodkowej w pobliżu pierwotnego splotu naczyń włosowatych przysadkowego układu wrotnego. Kumar i in. [107] stwierdzili kilkakrotnie większą koncentrację GnRH w buszno-przyśrodkowym podwzgórzu niż w obszarze nadskrzyżowaniowym i obszarze przedwzrokowym. Badania Zięcika i in. [226, 227] wykazały u loszek znacznie większą koncentrację GnRH w tkance kompleksu „szy-



Rysunek 1. Schemat przedstawiający ogólne zależności pomiędzy poszczególnymi piętrami osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej i jej oddziaływanie na macicę. Opis schematu znajduje się w tekście

puła-wyniosłość przyśrodkowa" (SME; stalk medial eminence) niż w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu (MBH) oraz obszarze przedwzrokowym (POA). Uwalnianie GnRH z wyniosłości przyśrodkowej do krążenia przysadkowego ma charakter pulsacyjny i wykazuje wysoką korelację ze zmianami koncentracji LH we krwi obwodowej [110].

Aktywność systemu GnRH-ergicznego jest regulowana na poziomie wytwarzania gonadoliberyny w perykarionach i/lub uwalniania jej z zakończeń nerwowych. W procesie tym uczestniczą liczne systemy neuralne, uwalniające klasyczne neuroprzekaźniki, takie jak: noradrenalina, dopamina, serotonina, kwas γ-aminomasłowy, kwas glutaminowy, jak również neuropeptydy, takie jak: endogenne peptydy opioidowe (EOP), galanina, neuropeptyd Y (NPY), substancja P [36, 95, 112, 122, 127]. Zięcik i in. [226, 227] stwierdzili u loszek podczas cyklu rujowego oraz indukowanego wyrzutu LH (benzoesanem estradiolu) wyższą zawartość nie tylko GnRH, ale i β-endorfiny, NPY i galaniny w SME niż POA lub MBH. Badania Fitki i in. [37] wykazały, że u loszek egzogenna tyroksyna znacznie obniża zawartość GnRH w wyniosłości przyśrodkowej. Badania przeprowadzone na loszkach w warunkach in vivo, w których blokowano lub stymulowano receptory opioidowe wykazały, że EOP wywierają hamujący wpływ na system GnRH/LH w okresie laktacji oraz uczestniczą w regulacji pulsacyjnego wydzielania LH podczas fazy ciałka żółtego [127] i ciąży (głównie do 70. dnia) [127, 204], jak również przedowulacyjnego lub indukowanego wyrzutu LH [96, 127, 223]. Znany jest również modulujący wpływ steroidów jajnikowych, estradiolu i progesteronu, na funkcjonowanie systemu GnRH u świń (rys. 1) [95, 128, 145]. Wyniki uzyskane przez Zięcika i in. [224] wskazują, że LH może także modulować aktywność podwzgórzowego systemu GnRH u świń, na zasadzie krótkiej pętli sprzężenia zwrotnego.

W warunkach in vitro testowano wpływ szeregu substancji na uwalanie GnRH z wyniosłości przyśrodkowej loszek. Okrasa i in. [128] stwierdzili, że nalokson (antagonista opioidowy) stymuluje uwalnianie GnRH z SME loszek w cyklu rujowym oraz loszek owariektomizowanych otrzymujących progesteron lub estradiol. Morfina (agonista opioidowy) – w zależności od dawki – może stymulować (2×10^{-6} M) lub hamować (10^{-3} M) uwalnianie GnRH z SME loszek owariektomizowanych otrzymujących progesteron (nie estradiol). U owariektomizowanych loszek z indukowanym wyrzutem LH, wykazano modulujący wpływ β-endorfiny, galaniny, NPY i substancji P na uwalnianie GnRH ze SME [70]. Ciereszko i in. [21] wykazali w badanich in vitro, że również prolaktyna może stymulować uwalnianie GnRH z SME loszek podczas fazy lutealnej. Z kolei w badaniach Duszy i in. [28] nie obserwowano u niedojrzałych płciowo loszek istotnego wpływu melatoniny na uwalnianie GnRH z SME.

Badania ostatnich lat wskazują, że leptyna – hormon w znacznej ilości wytwarzany przez tkankę tłuszczową – może także wpływać na aktywność układu GnRH/LH u loszek w określonych stanach fizjologicznych [4]. Zespół J. Przała, badając ekspresję genu leptyny i długiej formy jej receptora (OB-Rb) – metodami, takimi jak

RT-PCR, hybrydyzacja in situ oraz Western-blot – wykazał zmiany w strukturach powiązanych z wytwarzaniem i/lub uwalnianiem GnRH (POA, MBH i SME) u loszek w fazie lutealnej cyklu rujowego (dni 10–12 i 14–16) i w okresie wczesnej ciąży (dni 14–16 i 30–32) [148].

Badania zespołu wcześniej kierowanego przez T. Krzymowskiego, a obecnie przez S. Stefańczyk-Krzymowską wykazały, że na funkcjonowanie zarówno podwzgórza jak i przysadki może wpływać okołoprzysadkowy system naczyniowy, który tworzą naczynia żylne odprowadzające krew z mózgu, przysadki i okolicy twarzowej oraz naczynia tętnicze doprowadzające krew do przysadki i mózgu. System ten umożliwia przeciwprądową wymianę niektórych substancji oraz zwrotny ich transport do mózgu i przysadki. U loszek stwierdzono możliwość zwrotnego transportu GnRH poprzez ten system w określonych dniach cyklu rujowego (1–2 oraz 12–14) [65, 102]. W podobny sposób mogą być także transportowane inne substancje, takie jak: β-endorfina, oksytocyna, dopamina i hormony steroidowe [65, 149, 150]. Badania prowadzone przez ten zespół wykazały również możliwość transportowania feromonu knura (androstenolu) u loszek – z obszaru śluzówki jamy nosowej do struktur ośrodkowego układu nerwowego związanych z regulacją procesów rozrodczych – drogą krwionośną poprzez naczyniowy układ okołoprzysadkowy [99, 164]. Oznacza to, że sygnał zapachowy samca oddziałuje na organizm samicy nie tylko na drodze nerwowowej, jak wcześniej sądzono, ale również na drodze humoralnej.

Przysadka

W przedniej części przysadki występuje pięć rodzajów komórek wewnątrzwydzielniczych, które są rozmieszczone pomiędzy komórkami pęcherzykowo-gwiaździstymi. Są to komórki somatotropowe, kortykotropowe, laktotropowe, gonadotropowe i tyreotropowe. Komórkami docelowymi dla GnRH są komórki gonadotropowe, wytwarzające hormon luteinizujący (LH) i hormon folikulotropowy (FSH). Wydzielanie hormonów gonadotropowych jest jednak zróżnicowane, ponieważ wiele czynników wykazuje modulujący wpływ na ten proces. W regulacji wydzielania FSH ważną rolę pełnią aktywiny, inhibiny i folistatyny. Wśród czynników modulujących wydzielanie gonadotropin wymienia się m.in. płciowe hormony steroidowe (rys. 1), aminokwasy (glutaminian i asparaginian), szereg peptydów (np. NPY, VIP, substancja P, galanina, peptydy opioidowe), czynniki wzrostowe, aminy biogenne i tlenek azotu. Nadmienić należy, że w regulację wielu procesów związanych z rozrodem, oprócz hormonów gonadotropowych, włącza się również prolaktyna, wytwarzana przez komórki laktotropowe. Szczegółowy opis struktury i funkcji przedniej części przysadki można znaleźć w przeglądowym opracowaniu Duszy i Ciereszko [26].

Profile sekrecyjne LH u loszek w różnych okresach aktywności płciowej zostały opisane przez Zięcika i in. [221, 222], a prolaktyny – przez Duszę i Krzymowską [29, 30]. Kilka zespołów badawczych w kraju testowało w warunkach in vitro wpływ

różnych czynników na wydzielanie LH lub prolaktyny. Badania Kotwicy i in. [92] wykazały, że oksytocyna wytwarzana w tylnym płacie przysadki [91] stymuluje sekrecję LH i protaktyny, jak również ACTH i β-endorfiny, przez komórki przedniej części przysadki pochodzące od loszek w fazie lutealnej. Takiego działania oksytocyny nie odnotowano w odniesieniu do komórek przysadkowych pobranych od loszek w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego. Oksytocyna stymulowała również sekrecję LH i protaktyny przez komórki przedniej części przysadki pobierane od loszek owariektomizowanych podczas indukowanego wyrzutu LH oraz od loszek otrzymujących progesteron [9]. Z kolei VIP wykazywał stymulujący wpływ na sekrecję LH tylko przez komórki przysadki pobierane od loszek podczas indukowanego wyrzutu LH oraz wydzielanie prolaktyny przez komórki pochodzące od loszek po podaniu im zarówno benzoesanu estradiolu jak i progesteronu. Czynniki α- i β-adrenergiczne (fenylefryna i izoprenalina) także wykazywały stymulujący wpływ na sekrecję LH [146] i prolaktyny [147] in vitro, który był zależny od ich dawki i statusu hormonalnego loszek – dawczyń komórek przysadkowych.

Możliwość oddziaływania peptydów opioidowych na sekrecję LH na poziomie przysadki wykazały badania in vitro przeprowadzone przez Barba i in. [3]. Stwierdzono w nich, że β-endorfina zmniejsza, natomiast nalokson (antagonista receptorów opioidowych) zwiększa, wydzielanie LH przez komórki izolowane z przedniej części przysadki loszek. W badaniach innych autorów wykazano, że wydzielanie β-endorfiny przez komórki przysadki może zmieniać się m.in. pod wpływem oksytocyny [9, 92], czynników adrenergicznych [147] i VIP [9]. Badania prowadzone przy użyciu metody RT-PCR wskazują, że ekspresja genów kodujących prekursory peptydów opioidowych (POMC i prodynorfiny) i receptorów opioidowych (μ i κ) w przedniej części przysadki loszek zmienia się podczas cyklu rujowego [160, 216]. Sugeruje to udział EOP w modulacji wydzielania LH z przysadki u świń na zasadzie ich auto- i/lub parakrynnego działania.

W przedniej części przysadki loszek badano również ekspresję genów (mRNA) kodujących leptynę i jej receptor (OB-Rb), która wykazywała zmiany podczas cyklu rujowego (dni 10–12 i 14–16) i wczesnej ciąży (dni 14–16 i 30–32). Zawartość białka leptyny (określana metodą Western-blot) była większa, a jej receptora – mniejsza, w przysadce w okresie wczesnej ciąży (dni 10–12) w porównaniu z cyklem rujowym (dni 14–16) [148]. Wyniki te wskazują na udział leptyny w lokalnej regulacji wydzielania hormonów przysadkowych.

Obecnie często badany jest wpływ ksenobiotyków na procesy fizjologiczne na różnych modelach zwierzęcych (in vitro). Badania prowadzone przez zespół Ciereszko [97], z wykorzystaniem komórek izolowanych z przysadek loszek, wskazują na stymulujący wpływ dioksyny (TCDD; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny) na sekcecję prolaktyny we wczesnej fazie lutealnej, hamujący zaś – w fazie pęcherzykowej.

Jajnik

Podstawową funkcją jajnika jest cykliczne wytwarzanie i uwalnianie dojrzałych oocytów. Optymalne warunki do rozwoju oocytów zapewniają pęcherzyki jajnikowe, które w miarę dojrzewania podlegają charakterystycznym zmianom strukturalnym i czynnościowym [139]. W dojrzewającym pęcherzyku jajnikowym istotną rolę pełnią komórki osłonki wewnętrznej (*theca interna*) oraz warstwy ziarnistej (*membrana granulosa*). Cykliczność zmian zachodzących w jajniku u dojrzałych płciowo loszek – wynoszącą ok. 21 dni (cykl rujowy) – pośrednio warunkuje ciałko żółte (CL; *corpus luteum*), wytwarzając progesteron, który m.in. wpływa na wydzielanie gonadotropin. Z kolei, czas trwania CL jest kontrolowany przez czynniki pochodzenia macicznego. Hormony jajnikowe, głównie progesteron (P_4) i estradiol (E_2), oprócz oddziaływania na wyższe piętra osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej w ramach tzw. sprzężeń zwrotnych, wpływają również na macicę wywołując zmiany umożliwiające ewentualną implantację zarodków (rys. 1).

W obszarze podjajnikowym występuje tzw. okołojajnikowy kompleks naczyniowy, w którym naczynia tętnicze, żylne i chłonne tworzą specyficzny układ funkcjonalny, pozwalający na zwrotny (skierowany do jajnika) lub docelowy (tzn. z jajnika do macicy lub odwrotnie) transfer hormonów [101, 162, 165, 167, 168]. Opisany, w wielu pracach przez Krzymowskego i in. [101] i Stefańczyk-Krzymowską i in. [162, 165, 167, 168] mechanizm transportu hormonów w tym obszarze pozwala na oszczędną i zarazem skuteczną, do pewnego stopnia lokalną, gospodarkę hormonalną w obrębie układu rozrodczego samicy.

Wprowadzenie technik hodowli in vitro izolowanych komórek pęcherzyka jajnikowego (osłonki wewnętrznej i warstwy ziarnistej) oraz ciałka żółtego pozwoliło lepiej poznać zarówno ich zdolności sekrecyjne jak i substancje, które wykazują wobec nich działanie regulacyjne. W tym zakresie nieocenione są zasługi S. Stokłosowej, która w latach siedemdziesiątych ze swoim zespołem zorganizowała pracownię in vitro i wprowadziła metody hodowli m.in. komórek jajnika świni, a następnie służyła pomocą innym zespołom w Polsce w ich adaptacji w swoich laboratoriach [105, 171, 172, 175, 177, 178].

W odniesieniu do pęcherzyka jajnikowego, jak się wydaje, powszechnie przyjęta jest teoria „dwóch komórek, dwóch gonadotropin", która przypisuje komórkom osłonki wewnętrznej specjalizację w produkcji androgenów (pod wpływem LH), komórkom ziarnistym zaś przekształcanie ich, czyli tzw. aromatyzację, do estrogenów (pod wpływem FSH) [139, 170]. Badania Stokłosowej i in. [174] z roku 1982 wykazały możliwość wytwarzania estradiolu także w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka świni oraz wielokrotnie większą produkcję tego steroidu w hodowli mieszaniny komórek osłonki z komórkami ziarnistymi. W warunkach in vitro organizacja cytoszkieletu (mikrotubul) w komórkach ziarnistych świni zależy od obecności w hodowli komórek osłonki wewnętrznej i zmienia się pod ich wpływem [60]. Autorzy tych badań sugerują, że organizacja cytoszkieletu w komórkach pęcherzykowych ma związek z transportem androgenów do komórek ziarnistych.

Kluczową rolę w regulacji rozwoju pęcherzyków jajnikowych i powstawaniu ciałek żółtych oraz funkcjonowaniu tych struktur pełnią hormony gonadotropowe, FSH i/lub LH [26, 135, 170, 173, 228], których działanie jest wspomagane przez liczne substancje dostarczane z krwią lub wytwarzane lokalnie [139]. Prolaktyna jest hormonem, którego wpływ na procesy zachodzące w jajniku był rozpatrywany od wielu lat. U świń stwierdzono jej obecność w płynie pęcherzykowym [136]. Podawanie loszkom podczas fazy pęcherzykowej egzogennej prolaktyny powodowało obniżenie sekrecji estrogenów [27]. Z kolei luteotropowe działanie prolaktyny u świń w okresie wczesnej fazy lutealnej cyklu rujowego było stwierdzone, zarówno w badaniach in vivo jak i in vitro, przez Ciereszko i in. [19, 22]. W badaniach in vitro [22] wykazano, że stymulującemu działaniu prolaktyny na sekrecję P_4 towarzyszy wzrost aktywności kinazy białkowej C (PKC). Słomczyńska i in. [152] wykazali obecność receptorów prolaktyny w komórkach osłonki wewnętrznej średnich i dużych pęcherzyków jajnikowych oraz w nowo tworzących się ciałkach żółtych u świni. W badaniach in vitro przeprowadzonych przez Słomczyńską i in. [152] prolaktyna pobudzała aktywność sekrecyjną komórek osłonki (P_4 i E_2) oraz komórek lutealnych (P_4). Pobudzenie steroidogenezy w komórkach osłonki, ale nie uwalnianie z nich steroidów, przez prolaktynę było zależne od prawidłowej organizacji w nich cytoszkieletu [64]. Oprócz stymulacji steroidogenezy Ciereszko i in. [20] stwierdzili w komórkach osłonki wzrost aktywności PKC pod wpływem prolaktyny.

W badaniach in vivo, przeprowadzonych przez Krzymowskiego i in. [100] domaciczne infuzje PGF2α wykazywały luteolityczne działanie, powodując zdecydowane obniżenie sekrecji P_4 u loszek w 12, 14 i 15 dniu cyklu rujowego. W warunkach in vitro, także potwierdzono luteolityczny wpływ PGF2α na komórki lutealne [58]. U różnych gatunków również udział oksytocyny w procesie luteolizy jest rozpatrywany. Badania Kotwicy [89] wskazują, że oksytocyna uczestniczy w regulacji luteolizy u świń, ponieważ hamowaniu sekrecji P_4 towarzyszy – oprócz wzrostu sekrecji PGF2α – także wzrost koncentracji oksytocyny we krwi pobieranej z żyły maciczno-jajnikowej (UOV) i żyły jarzmowej (JV). Wzrost ten był nieco większy w UOV niż w JV. Wskazuje to na możliwość produkcji pewnej ilość oksytocyny w jajniku świni, ale byłyby to ilości, jak sądzi autorka, znacznie mniejsze niż u przeżuwaczy.Wcześniesze badania in vivo Duszy i in. [31] wskazywały również na możliwość udziału prolaktyny w procesie luteolizy u świń. Stwierdzono w nich bowiem korelację pomiędzy pulsami prolaktyny i PGF2α we krwi żyły UOV u loch w 14–17 dniu cyklu rujowego.

Na procesy zachodzące w jajniku, oprócz gonadotropin i prolaktyny, mają także wpływ substancje o działaniu wzrostowym, takie jak: hormon wzrostu (GH) i insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I). Stymulują one sekrecję estradiolu w pęcherzykach jajnikowych świni – szczególnie dużych – oraz proliferację komórek tylko w małych i średnich pęcherzykach, a nie w dużych pęcherzykach [83]. GH i IGF-I wykazują także wpływ na CL u świń. We wczesnej i środkowej fazie lutealnej pobudzają produkcję P_4, a hamują proces apoptozy [141, 142].

Neuropeptyd, LHRH, może być także wytwarzany w jajniku [111] i lokalnie wpływać na proces steroidogenezy pęcherzykowej. Badania Stokłosowej i in. [176] wskazują, że LHRH wywiera bardzo zróżnicowany wpływ na steroidogenezę w komórkach pęcherzyka jajnikowego w zależności od fazy jego rozwoju oraz warunków hodowli komórek (monokultury czy kokultury). W hodowlach mieszanych peptyd ten zwiększał sekrecję E_2, natomiast zmniejszał P_4 z komórek izolowanych z małych i średnich pęcherzyków jajnikowych, hamował zaś wydzielanie obu steroidów z komórek pochodzących z dużych pęcherzyków. Peptyd ten nie wykazywał jednak wpływu na wydzielanie P_4 przez komórki lutealne loszek w okresie cyklu rujowego i wczesnej ciąży [57].

W zespole J. Przała wykonano szereg badań dotyczących udziału peptydów opioidowych w lokalnej regulacji procesów zachodzących w jajniku świni. Wykazano obecność β-endorfiny w płynie pęcherzykowym [77] i ciałku żółtym [137] oraz sekrecję jej w warunkach in vitro przez komórki pęcherzykowe [74, 77] i lutealne [138]. Zawartość β-endorfiny w ciałku żółtym u loszek wzrasta w miarę jego rozwoju [137]. Koncentracja β-endorfiny także zmienia się w płynie pęcherzykowym podczas cyklu rujowego, wykazując największe wartości w małych pęcherzykach pochodzących od loszek we wczesnej fazie lutealnej [77]. Fakt ten może być powiązany z hamowaniem rozwoju pęcherzyków jajnikowych.W badaniach in vitro wykazano, że sekrecja β-endorfiny przez komórki ziarniste jest silnie stymulowana przez FSH [77]. W badaniach Staszkiewicza i in. [159] wykazano również stymulujący wpływ FSH na ekspresję genu kodującego prekursor β-endorfiny – proopiomelanokortynę (POMC) – w komórkach ziarnistych z dużych pęcherzyków jajnikowych. W badaniach tych stwierdzono ekspresję genów kodujących prekursory opioidowe (POMC, proenkefalinę i prodynorfinę), zarówno w komórkach ziarnistych, jak i komórkach osłonki wewnętrznej oraz komórkach lutealnych [158, 159]. Badania powyższe wskazują, że poziom ekspresji genów prekursorów opioidowych w steroidogenicznych komórkach jajnika może być zależny od odpowiednich hormonów gonadotropowych, LH lub FSH. Badania Słomczyńkiej i in. [153] potwierdziły obecność peptydów powstających z prodynorfiny w płynie pęcherzykowym loszek. Z kolei, badania Happoli i in. [66] wskazują, że zródłem peptydów opioidowych w jajniku świni mogą być również zakończenia włókien nerwowych.

W badaniach in vitro potwierdzono wpływ peptydów opioidowych na steroidogenezę jajnikową. Wykazano hamujący wpływ agonistów receptorów opioidowych (μ, δ i κ) na ten proces w komórkach pęcherzyka jajnikowego – osłonki wewnętrznej [76, 78] i warstwy ziarnistej [75, 78] – po 4-godzinnej ich ekspozycji na badane czynniki. Gregoraszczuk i Słomczyńska [63] obserwowały także hamujący wpływ β-endorfiny na podstawową sekrecję P_4 (nie E_2) przez komórki ziarniste pochodzące z małych i średnich pęcherzyków jajnikowych oraz na wydzielanie zarówno P_4 jak i E_2 w obecności LH przez komórki ziarniste małych, średnich i dużych pęcherzyków jajnikowych. Z kolei stymulujący wpływ agonisty opioidowego (FK 33-824), o wysokim powinowactwie do receptorów typu μ, na sekrecję steroidów przez komórki

pęcherzyka jajnikowego oraz komórki lutealne był obserwowany po zastosowaniu dłuższej inkubacji (24-godzinnej) badanych komórek z tym agonistą [74, 77, 140]. W komórkach lutealnych wykazano także modulujący wpływ FK 33-824 na ekspresję receptora LH [73]. Badania dotyczące udziału wewnątrzkomórkowych szlaków w przekazywaniu pobudzenia – od receptora opioidowego typu μ – wykazały, że proces ten jest zróżnicowany w komórkach pęcherzykowych świni. W komórkach osłonki wewnętrznej uczestniczy w nim cyklaza adenylanowa (AC) i fosfolipaza C (PLC), w komórkach ziarnistych zaś – AC, natomiast nie stwierdzono reakcji PLC [71, 72, 78].

W badaniach prowadzonych przez Gregoraszczuk i in. [59, 62] wykazano obecność leptyny w płynie pęcherzykowym i ekspresję genu długiej formy jej receptora (OB-Rb) w komórkach pęcherzyka jajnikowego w różnych stadiach rozwoju i w nowo tworzącym się CL u świń. Ponadto stwierdzono, że leptyna hamuje sekrecję E_2, a pobudza sekrecję P_4 w dużych pęcherzykach, co sugeruje udział tego peptydu w regulacji procesu luteinizacji. Badania Gregoraszczuk i in. [61, 62] wskazują także na współdziałanie leptyny z IGF-I w regulacji funkcji pęcherzyka jajnikowego świni. Mianowicie IGF-I wzmaga ekspresję genu długiej formy receptora leptyny (OB-Rb) i w jej obecności efektywniej stymuluje sekrecję E_2. Z kolei leptyna zmniejsza antyapoptotyczne działanie IGF-I na komórki pęcherzyka. Smolińska i in. [156] wykazali ekspresję genu kodującego leptynę i jej receptor (OB-Rb) w strukturach jajnika loszek w cyklu rujowym (dni 10–12 i 14–16) i w okresie wczesnej ciąży (dni 14–16 i 30–32). Stwierdzone przez autorów zmiany w ekspresji tych genów sugerują udział leptyny w regulacji także czynności ciałka żółtego, w rozpatrywanych okresach fizjologicznych.

W jajniku loszek wykazano wzrost zawartości noradrenaliny pod wpływem estrogenów, któremu towarzyszyło zwiększenie liczby adrenergicznych włókien nerwowych [108]. Badania in vitro wykazały stymulujący wpływ izoprenaliny (agonisty receptorów β-adrenergicznych) na sekrecję P_4 przez komórki ziarniste z dużych i małych pęcherzyków jajnikowych pochodzących od loszek w cyklu rujowym [212]. Katecholaminy także stymulowały sekrecję P_4 przez komórki lutealne loszek w okresie wczesnej ciąży [213].

Badania prowadzone przez zespół Ciereszko [97, 125] wskazują na możliwość oddziaływania estrogenów środowiskowych na komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego świni. Genistaina (fitoestrogen) – samodzielnie oraz w obecności FSH i IGF-I – stymulowała in vitro sekrecję E_2 przez komórki ziarniste [125]. Z kolei wydzielanie P_4 było hamowane przez genistainę i daidzeinę (inny fitoestrogen), samodzielnie i w połączeniu z IGF-I. Badania immunocytochemiczne wykazały wzrost poziomu receptorów estrogenowych typu β (ERβ) w tych komórkach pod wpływem E_2, genistainy i daidzeiny. Dioksyna (TCDD; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny) także oddziałuje na steroidogenezę w komórkach ziarnistych oraz modyfikuje wpływ prolaktyny na te komórki [97].

Macica

Zapoczątkowanie ciąży wymaga zasygnalizowania przez zarodki swojej obecności w macicy, w której muszą być stworzone odpowiednie warunki do podtrzymania ich rozwoju oraz implantacji. Badania dotyczące macicy – prowadzone w Polsce i na świecie – najczęściej mają na celu wyjaśnienie interakcji pomiędzy jajnikiem i macicą, które towarzyszą regresji cyklicznego ciałka żółtego, jak również przedłużeniu jego funkcjonowania w okresie wczesnej ciąży, a także poznanie mechanizmu tzw. matczynego rozpoznania ciąży oraz czynników warunkujących prawidłową implantację [230].

U świń rozwijający się zarodek wytwarza i wydziela estrogeny, które pełnią kluczową rolę w uruchomieniu mechanizmu ochraniającego ciałko żółte przed regresją. Z kolei, w macicy wytwarzane są prostaglandyny; PGF2α – działająca luteolitycznie oraz PGE2 – wykazująca działanie luteotropowe/antyluteolityczne (rys. 1). Wcześniej wytwarzanie prostaglandyn przypisywano błonie śluzowej macicy (głównie nabłonkowi śluzówki) [208, 210]. Ostatnie badania Franczak i in. [38] wykazały obecność mRNA syntaz prostaglandyn, PGF2α i PGE2, w mięśniówce macicy oraz możliwość ich wytwarzania przez tę tkankę podczas luteolizy i w okresie wczesnej ciąży. W badaniach tych stwierdzono także wzrost wydzielania prostaglandyn in vitro przez mięśnówkę macicy pod wpływem oksytocyny, który ulegał znacznemu zmniejszeniu w obecności progesteronu. Stymulacja wydzielania PGF2α przez egzogenną oksytocynę w warunkach in vivo jest możliwa dopiero po znacznym obniżeniu koncentracji progesteronu we krwi. Ostatnie badania Oponowicz i in. [130], przeprowadzone metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym, wykazały wyższy poziom mRNA prekursora receptora oksytocyny w warstwie śluzowej i mięśniowej macicy u loszek podczas luteolizy (14–16 dnia cyklu) niż u loszek w okresie wczesnej ciąży (14–16 dnia). Wcześniejsze badania Kotwicy i in. [90] wykazały stosunkowo niską korelację (ok. 30%) pomiędzy pulsami w wydzielaniu oksytocyny i PGF2α u loch w okresie okołoluteolitycznym. Badania Wacławik i in. [210] przeprowadzone techniką RT-PCR i Western-blot, wykazały ekspresję syntaz prostaglandyn w zarodkach świni, szczególnie wysoką syntazy PGE2 w 10–12 dniu ciąży, tj. w okresie matczynego rozpoznania obecności zarodków w macicy.

Istnieje kilka koncepcji dotyczących przebiegu procesów prowadzących do regresji CL podczas cyklu rujowego lub jego przetrwania w okresie wczesnej ciąży u świń. Szczegółowa ich prezentacja przekracza zakres tego opracowania, dlatego zostaną one tylko wymienione z podaniem krótkiej charakterystyki. Pełniejsze omówienie można znaleźć w pracach źródłowych lub opracowaniach przeglądowych poświęconych tej tematyce.

1. Bazer i Thatcher [5] postulowali zmianę sekrecji PGF2α w macicy z endokrynnej – do krwi (w okresie luteolizy) na egzokrynną – do jej światła (podczas ciąży). Zespół Mirando, rozwijając tę koncepcję, wskazał na oksytocynę jako czynnik

mogący inicjować pulsy PGF2α w okresie cyklu rujowego [14], która nie ma takiej możliwości działania w okresie ciąży [123].

2. Teoria Krzymowskiego i Stefańczyk-Krzymowskiej [103, 104] jest w pełni oryginalna i w inny sposób łaczy fakty, które prowadzą do luteolizy u świń. Autorzy tej teorii wskazują, że zapoczątkowanie luteolizy jest następstwem drastycznie zmniejszającego się ukrwienia macicy pod wpływem progesteronu i powstającej w niej hipoksji. Po osiągnięciu punktu krytycznego (12. dnia cyklu) stan ten prowadzi do wystąpienia zmian regresyjnych w endometrium powiązanych z uwalnianiem PGF2α, która po dotarciu do jajnika indukuje regresję ciałka żółtego. W okresie wczesnej ciąży zmniejszeniu zaopatrzenia macicy w krew przeciwdziałają substancje wydzielane głównie przez zarodek i/lub macicę (np. estrogeny, PGE2), które wpływają relaksująco na naczynia doprowadzające do niej krew. Ponadto w okresie wczesnej ciąży odpowiednio modulowany jest transfer prostaglandyn w obszarze naczyń krwionośnych i limfatycznych krezki macicy [98, 161, 163, 166].
3. Zięcik i in. [229] pierwszoplanową rolę – spośród czynników mogących stymulować wytwarzanie/wydzielanie PGF2α podczas luteolizy – przypisują LH. Stwierdzenie to uzasadniają występowaniem dużej koncentracji receptorów LH w śluzówce macicy w okresie okołolitycznym [231] i zdolnością LH do stymulowania w warunkach in vitro sekrecji PGF2α z jej skrawków [169], a także wysokiej korelacji pulsów w wydzielaniu LH i PGF2α (75,5%). W okresie wczesnej ciąży mechanizm ochrony ciałka żółtego przed regresją polegałby na blokowaniu receptorów LH.
4. Według koncepcji Wuttke i in. [215] procesy prowadzące do luteolizy związane są głównie ze zmianami zachodzącymi w starzejącym się ciałku żółtym, które zapoczątkowuje TNFα, początkowo wytwarzany przez duże komórki lutealne (razem z różnymi peptydami, np. OT), a następnie także przez makrofagi, które na zasadzie chemotaksji dokonują inwazji CL. W tych warunkach jeszcze bardziej zwiększona produkcja TNFα (przez makrofagi) prowadzi do zmniejszenia produkcji E_2 oraz ograniczenia luteotropowego wpływu tego steroidu na CL, a tym samym do dominacji luteolitycznego działania PGF2α.

Badania ostatnich lat przynoszą także informacje o nowych czynnikach powiązanych z procesem matczynego rozpoznanie ciąży lub implantacją. Jedną z nich jest związek lipidowy, kwas lizofosfatydowy (LPA; lysophosphatidic acid), który – działając poprzez receptor LPA3 – zwiększa aktywność cyklooksygenazy-2 (COX-2) i syntezę prostaglandyn w śluzówce macicy [220]. U myszy zidentyfikowano ścieżkę sygnalną Wnt/β-katenina [124], która jest dwufazowo aktywowana w macicy po uwolnieniu estrogenów przez blastocystę; najpierw w wielu miejscach mięśniówki okrężnej (co ma związek z właściwym rozmieszczeniem zarodków podczas implantacji), a następnie w nabłonku powierzchniowym śluzówki (co wiąże się z modulacją

ekspresji genów docelowych, m.in. genu COX-2). Aktywacja ścieżki Wnt/β-katenina następuje poprzez białko Wnt, wytwarzane przez zarodek lub macicę w odpowiedzi na sygnał pochodzący z zarodka. Wydaje się, że powyższe czynniki pełnią istotną rolę w interakcji pomiędzy zarodkiem i macicą, jednakże w piśmiennictwie dotychczas brak danych o ich występowaniu i roli u świń.

W badaniach prowadzonych przez Szafrańską i in. [202] oraz Panasiewicza i in. [132] sklonowano i określono sekwencję ośmiu cDNA, które kodują glikoproteiny ciążowe u świń (pPAG; porcine Pregnancy Associated Glycoproteins). W przypadku pPAG2, poznano pełną strukturę jego genu [200]. Wśród poznanych pPAG wyróżnia się pPAG1-podobne (pPAG1, 3, 5) – potencjalnie aktywne enzymatycznie i pPAG2-podobne (pPAG2, 4, 6, 8, 10) – nieczynne enzymatycznie. Badania Majewskiej i in. (dane niepublikowane) wskazują na lokalizację genów pPAG w pozycji SSC1q18-1q24 (metoda FISH) oraz sugerują (analiza in silico) występowanie ich w czterech innych miejscach genomu świni. Wykazano również ekspresję transkryptów [201] i białka [118] pPAG w łożysku świni w różnych okresach ciąży. Badania radioreceptorowe wskazują, że białka pPAG mogą oddziaływać na receptory LH/hCG w macicy i ciałku żółtym świni [131, 203].

Macica jest narządem, w którym – ze względu na nieustannie zachodzące zmiany powiązane z pełnioną funkcją – ma miejsce wytwarzanie wielu substancji zaangażowanych w procesy regulacyjne. Zarówno podczas cyklu rujowego, jak i w okresie ciąży stwierdzono w niej ekspresję genów, leptyny i jej receptora (OB-RB) [155]. W okresie wczesnej ciąży wykazano (metodą hybrydyzacji in situ) wzrost mRNA leptyny w śluzówce i mięśniówce macicy, jej receptora zaś tylko w mięśniówce (30.–32. dnia w porównaniu z 14.–16. dniem). W tym okresie zawartość mRNA leptyny w trofoblaście obniżała się, jej receptora zaś – ulegała znacznemu podwyższeniu. Przypuszcza się, że powyższe zmiany są powiązane z procesem implantacji. W tkankach macicy i jajowodu stwierdzono także obecność takich peptydów, jak: β-endorfina, GnRH, galanina, VIP i NPY. Ich zawartość w macicy loszek owariekomizownych zmieniała się po podaniu benzoesanu estradiolu [129, 211]. Badania Słomczyńskiej i in. [154] wykazały obecność receptora androgenowego w macicy ciężarnych loch. Jego koncentracja, szczególnie wysoka w endometrium, obniżała się w miarę upływu ciąży. U płodów receptor androgenowy pojawiał się już 22. dnia ciąży. Interesujące są wyniki wstępnych badań akwaporyn (AQP; białek kanałów wodnych) w macicy świń [151]. Stwierdzono w niej występowanie trzech form (AQP1, 5 i 9) spośród pięciu przebadanych akwaporyn (AQP1, 2, 5, 7 i 9).

Badania o znaczeniu praktycznym wykonywane były przez Duszę i in. [32, 33]. Wykazano w nich wysoką korelację zmian elektrycznej oporności śluzu pochwowego z wyrzutem LH u loch [32]. Na tej podstawie prosty pomiar oporności elektrycznej śluzu pozwala określić optymalny czas inseminacji loch, od którego zależy skuteczność krycia. W innych badaniach Dusza i in. [33] stwierdzili, że jednorazowa domięśniowa injekcja preparatu (Biolactin-2), zawierającego prolaktynę w ilości 5 mg, skutecznie pobudzała laktację u loch z objawami zespołu bezmleczności poporodowej.

Molekularne mechanizmy sterowania funkcjami reprodukcyjnymi samca

Czynniki wpływające na produkcję i jakość nasienia

Produkcja i jakość nasienia jest uwarunkowana wieloma – zarówno endogennymi jak i egzogennymi – czynnikami, m.in. takimi jak status hormonalny, zmiany genetyczne (mutacje i aberacje chromosomowe), wiek, żywienie, intensywność użytkowania, pora roku, czy też stosowane środki farmakologiczne [179].

Następstwa zakłóceń statusu hormonalnego u knurów rozpłodowych były badane przez zespół Strzeżka [48]. Podanie knurom antyandrogenu, octanu cyproteronu (CPA) spowodowało obniżenie ($P \leq 0{,}001$) koncentracji LH, testosteronu, estronu i siarczanu estronu we krwi. Zmianom tym towarzyszyło zmniejszenie całkowitej objętości i frakcji nasiennej ejakulatu. Odnotowano wzrost koncentracji oraz całkowitej liczby plemników w ejakulacie. Indukowana antyandrogeneza wywołała zmiany parametrów biochemicznych wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych. Obok obniżenia stężenia glukozy, kwasu cytrynowego i jonów cynkowych, występowały także drastyczne zmiany w układach białkowych plazmy nasienia, których sekrecja u knura jest związana głównie z najądrzami i gruczołami pęcherzykowymi. Stwierdzono zmiany profilu elektroforetycznego molekularnych form fosfatazy kwaśnej i alkalicznej. Powyższe zmiany biochemiczne pociągnęły za sobą zaburzenia w dojrzewaniu plemników, objawiające się wzrostem odsetka plemników z proksymalną i dystalną kroplą oraz plemników wykazujących aglutynację. Wyniki te wskazują, że nawet znacznie obniżona adrogeneza nie upośledza u knurów procesu wytwarzania plemników, lecz niekorzystnie wpływa na ich dojrzewanie poprzez zakłócenie funkcji najądrzy i dodatkowych gruczołów płciowych, głównie pęcherzykowych.

Liczne badania wskazują, że częstotliwość ejakulacji wpływa na ilościowe i jakościowe parametry nasienia knura [10, 80, 180, 181, 188]. Strzeżek i in. [188] stwierdzili, że zwiększona częstotliwość pobierania nasienia prowadzi do zmniejszenia koncentracji i całkowitej liczby plemników w ejakulacie, obniżonej ruchliwości i oporności osmotycznej plemników oraz zwiększonego udziału plemników uszkodzonych. W testach opróżniania [180, 181], obejmujących 15–22 ejakulacji w ciągu 10 dni, odnotowano zaburzenia funkcji sekrecyjnych najądrzy i gruczołów pęcherzykowych; m.in. zmniejszenie aktywności białkowych ligandów cynkowych. Plemniki wykazywały uszkodzenia chromatyny i zwiększoną podatność na aglutynację. Niekorzystne zmiany jakości nasienia podczas testu opróżniania były mniej nasilone w okresie jesiennym w porównaniu z porą letnią. Powyższe badania wskazują, że nadmierna częstotliwość pobierania nasienia może naruszyć spermatogeniczną i/lub sekrecyjną funkcję jąder, najądrzy oraz dodatkowych gruczołów płciowych knura.

Zrównoważona – pod względem energetycznym, zawartości białka oraz składników mineralnych i witamin – dieta jest bardzo ważnym czynnikiem w rozpło-

dowym użytkowaniu knura [79, 113, 114, 119]. Stąd też podejmowane są badania następstw uzupełniania diety knurów w substancje, które potencjalnie mogą wpływać na jakość nasienia. Interesujące są badania dotyczące diet wzbogaconych w substancje wykazujące właściwości antyoksydacyjne ze względu na podatność plemników na stres oksydacyjny. Wynika ona z dużej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (C20/22) w plazmolemie plemnika oraz z jego niskiego potencjału antyoksydacyjnego [1, 126, 143, 197]. Badania Brzezińskiej-Ślebodzińskiej i in. [11] wykazały, że wzbogacenie diety w witaminę E zwiększa koncentrację plemników w ejakulacie knura. Z kolei w badaniach Strzeżka i in. [184] dodanie do diety knura preparatu PROSPERM – zawierającego wielonienasycone kwasy tłuszczowe, witaminy (E i C) i selen – korzystnie wpłynęło na biologiczne właściwości plemników. Odnotowano wzrost ogólnej liczby plemników w ejakulacie, wykazujących wyższą żywotność i oporność na zmiany ciśnienia osmotycznego. Zwiększonej produkcji dialdehydu malonowego (MDA) – wskaźnika indukowanej peroksydacji lipidów – towarzyszył wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w plemnikach i plazmie nasienia, w której zawartość niskocząsteczkowych antyoksydantów (askorbinianu i glutationu) także była podwyższona. W ostatnio przeprowadzonych badaniach Udała i in. [207] stwierdzili, że zastosowanie dodatku suszu z owoców, warzyw i ziół – wzbogacającego dietę w składniki mineralne, witaminy, garbniki, pektyny, likopeny, saponiny i inne związki – korzystnie wpływa na jakość nasienia, m.in. zwiększając objętość ejakulatu i koncentrację w nim plemników. Z kolei dodatek do paszy L-karnityny – stosowanej w żywieniu knurów rasy pietrain – zwiększył ogólną liczbę plemników w ejakulacie oraz spowodował zmniejszenie głównych i podrzędnych zmian morfologicznych plemników [69].

Spośród substancji farmakologicznych, testowany był m.in. wpływ atropiny (parasympatycznego blokera) i substancji adrenergicznych na cechy nasienia. Iniekcje atropiny spowodowały znaczne zmniejszenie objętości ejakulatu i korzystnie wpłynęły na wiele parametrów nasienia [183]. Spowodowały wzrost koncentracji fruktozy, kwasu cytrynowego, cynku i białek w plazmie nasienia oraz zwiększenie aktywności antyoksydacyjnej i antyproteolitycznej. Badania elektroforetyczne wykazały zmiany molekularnego profilu fosfataz i inhibitorów proteaz. Plemniki zachowywały większą żywotność podczas przechowywania w temperaturach 5° i 16°C. We wcześniejszych badaniach, przeprowadzonych przez Dubiela i in. [25], sprawdzano wpływ podawania (w odstępie 30 min) knurom eksploatowanym rozpłodowo 1–2 razy w tygodniu lub codziennie kolejno antagonisty receptorów β-adrenergicznych (propranololu) i agonisty receptorów α-adrenergicznych (levonoru) na cechy nasienia. Przy dwukrotnej w tygodniu eksploatacji knurów, substancje adrenergiczne spowodowały zwiększenie ogólnej liczby plemników w ejakulacie i odsetka plemników wykazujących prawidłowy ruch oraz wzrost aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) i fukozydazy. Ze wzrostem intensywności użytkowania rozpłodowego knurów, wpływ badanych substancji na parametry nasienia zmieniał się,

prowadząc do zmniejszenia liczby plemników i zawartości białka w ejakulacie oraz aktywności hialuronidazy.

Badania przeprowadzone przez Gączarzewicza i in. [52] wykazały, że w warunkach zakładu unasieniania zwierząt najczęściej występującymi zmianami głównymi i podrzędnymi, którym ulegają plemniki są krople cytoplazmatyczne obecne na wstawce, odpowiednio w położeniu bliższym i dalszym. Wysoki odsetek plemników ze zmianami głównymi i/lub podrzędnymi w ejakulacie knura może być związany z występowaniem większej liczby plemników z uszkodzonym akrosomem i zaburzeniami funkcjonowania aparatu ruchu. Na uwagę zasługuje obserwacja Lasoty i in. [109] wskazująca na to, że zwiększonej zawartości ołowiu w osoczu nasienia knura może towarzyszyć wzrost odsetka plemników ze zmianami podrzędnymi. Zależność ta jest ważna ze względu na możliwość wystąpienia podwyższonej zawartości tego pierwiastka w surowcach paszowych.

Proteomika plazmy nasienia

Termin proteomika pochodzi od wyrażenia angielskiego (PROTEin products expressed by the genOME) i oznacza kierunek badawczy zajmujący się ilościowym i jakościowym porównywaniem proteomów, czyli zespołów białek kodowanych przez genom. Analiza ta uwzględnia ich strukturę, lokalizację, modyfikację, interakcję, aktywność i funkcję. Proteomika jest ważnym elementem biologii reprodukcyjnej samca, ponieważ nasienie jest bogate w różnorodne białka i peptydy, od których zależy jego wartość biologiczna. Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie od wielu lat specjalizuje się w badaniach z zakresu proteomiki nasienia. Jej pracownicy wyizolowali i scharakteryzowali szereg białek i peptydów plazmy nasienia knura (tab. 1).

Plazma nasienia knura przejawia właściwości precypitujące fosfolipidy żółtka jaja [115]. Badania Strzeżka i Hopfer [193] oraz Strzeżka i in. [194] wykazały, że efekt ten jest zależny od białka, wytwarzanego przez gruczoły pęcherzykowe, którego aktywność jest uwarunkowana koncentracją jonów cynkowych (Zn^{2+}). W badaniach tych dokonano izolacji i charakterystyki tego białka. Stwierdzono, że może ono opłaszczać region wstawkowy plemnika i kontrolować transport błonowy. Wykazano także jego działanie przeciwbakteryjne, skierowane głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim [194].

Spermadhezyny są wielofunkcyjnymi białkami, którym m.in. przypisuje się udział w procesie zapłodnienia oocytu [13, 205]. Są one wytwarzane głównie przez gruczoły pęcherzykowe, a w niektórych przypadkach przez najądrza i sieć jąder [12]. Ich zawartość w plazmie nasienia jest mniejsza u knurów starszych w porównaniu z młodymi [198]. U knurów dotychczas zidentyfikowano siedem spermadhezyn: PSP-I i II, AQN-1, 2 i 3 oraz AWN i DQH [190]. Spermadhezyny AQN-3, AWN i DQH (pB1) tworzą glikoproteinowy kompleks o masie cząsteczkowej 54 kDa, który został wyizolowany z płynu gruczołów pęcherzykowych przez Strzeżka i Hołody [67,

Tabela 1. Białka i peptydy wyizolowane z plazmy nasienia knura przez pracowników Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie

Substancja	Miejsce sekrecji	Piśmiennictwo
Białko zależne od jonów Zn^{2+}	• gruczoły pęcherzykowe	Strzeżek i Hopfer [193] Strzeżek i wsp. [194]
Czynnik hamujący ruchliwość plemników (SMIF)	• gruczoły pęcherzykowe	Strzeżek i in. [195] Velev i in. [209] Kordan i in. [85]
Wysokocząsteczkowy inhibitor proteinaz	• gruczoły pęcherzykowe • najądrza	Torska i Strzeżek [206] Strzeżek i Torska [199]
Glikoproteina 54 kDa (GP 54)	• gruczoły pęcherzykowe	Hołody i in. [68] Strzeżek i Hołody [192] Hołody i Strzeżek [67] Kordan i in. [86] Płucienniczak i in. [133]
Fosfataza kwaśna	• gruczoły pęcherzykowe • najądrza	Wysocki i Strzeżek [219] Wysocki i Strzeżek [218] Wysocki i Strzeżek [217]
Acetylohydrolaza płytkowego czynnika aktywującego (PAF-AH)	• gruczoły pęcherzykowe • prostata	Kordan i in. [84] Kordan i Strzeżek [87] Kordan i in. [88]
Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)	• gruczoły pęcherzykowe • najądrza • prostata	Kuklińska i Strzeżek [106] Kowalowka i in. [93]

192]. Stwierdzono, że wykazuje on wyjątkowe właściwości biologiczne, obok wysokiego powinowactwa do jonów Zn^{2+} przejawia działanie immunosupresyjne (hamowanie proliferacji limfocytów), antyproteolityczne, hemaglutynacyjne, hamujące ruchliwość plemników i precypitujące lipoproteiny żółtkowe. Po raz pierwszy sklonowano i zsekwencjonowano cDNA kodujące komponent DQH (Gene Bank accession No. 047026) [133]. Dalsze badania, prowadzone przez Kordana i in. [86], wykazały, że białko DQH (15 kDa) zawiera w swoim składzie wcześniej zidentyfikowany peptyd o masie cząsteczkowej 5,7 kDa [195], który został nazwany – od jednej z jego funkcji – czynnikiem hamującym ruchliwość plemników, SMIF (sperm motility inhibiting factor). Użycie w tych badaniach przeciwciał pozwoliło wskazać, że zarówno Gp 54 jak i SMIF mogą realizować wpływ modulujący ruchliwość plemników poprzez wiązanie z receptorami plazmolemy regionu wstawkowo-witkowego plemnika.

Prace Kordana i in. [84, 88] doprowadziły do wyizolowania acetylohydrolazy płytkowego czynnika aktywującego (PAF-AH) z plazmy nasienia knura i poznania jej właściwości biochemicznych i roli w układzie rozrodczym knura. PAF-AH reguluje poziom płytkowego czynnika aktywującego (PAF), który jest związany z plazmolemą plemników i wpływa na ich ruchliwość [87]. W układzie rozrodczym źródłem tego enzymu są gruczoły pęcherzykowe i prostata. Jest on wiązany przez plemniki i bierze udział w ich kapacytacji oraz reakcji akrosomowej, jak również w procesie dekapacytacji.

Wysocki i Strzeżek [219] zidentyfikowali cztery formy molekularne fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia knura. Następnie dokonali izolacji i charakterystyki

właściwości biochemicznej fosfotyrozynowej fosfatazy kwaśnej, katalizującej defosforylację reszt fosfotyrozynowych [218]. Bogatym jej źródłem są gruczoły pęcherzykowe. Przypuszcza się, że enzym ten uczestniczy m.in. w reakcji akrosomowej i procesie zapłodnienia oocytu [190]. Ostatnio wyizolowana została z najądrzy knura fosfataza kwaśna o masie 50 kDa, która charakteryzuję się niską swoistością substratową [217]. Sugerowany jest jej związek z procesem dojrzewania plemników w najądrzach. Zmiany elektroforetycznego profilu fosfataz, wywołane blokowaniem steroidogenezy jądrowej octanem cyproteronu u knurów, wskazują na zależność ekspresji genu kodującego ten enzym od androgenów [191]. Z płynu najądrzy knura wcześniej została wyizolowana przez Glogowskiego i Strzeżka [55, 56] także fosfataza alkaliczna. Enzym ten wiąże się z plazmolemą plemnika i prawdopodobnie, poprzez udział w transporcie jonów wapnia, aktywuje reakcję akrosomową. Późniejsze badania Glogowskiego i in. [53] wykazały, że związki z grupy metyloksantyn (np. pentoksyfilina, teofilina) – dodawane do rozcieńczalników w celu zabezpieczenia wyższej wartości biologicznej nasienia – powodują wzrost aktywności alkalicznej fosfatazy. W najądrzach, które są miejscem magazynowania i degradacji (starzejących się) plemników, wykazano również obecność i dużą heterogenność deoksyrybonukleaz [24]. Fakt ten jest wiązany z procesami dojrzewania materiału genetycznego plemników i degradacji DNA obumierających komórek.

Aminotransferaza asparaginianowa (AspAT) została wyizolowana z plemników knura i przebadana pod kątem właściwości fizykochemicznych przez Ciereszkę i Strzeżka [18]. Enzym ten charakteryzuje się niską stabilnością, a podczas konserwacji nasienia podlega wyciekowi z plemników [16, 189]. W dalszych badaniach potwierdzono jego przydatność do oceny wartości biologicznej konserwowanego nasienia [15].

Plemniki wymagają szczególnej ochrony przed działaniem reaktywnych form tlenu. Strzeżek i in. [196, 197] przeprowadzili badania dotyczące zawartości czynników antyoksydacyjnych – zarówno enzymatycznych jak i niskocząsteczkowych – w plazmie nasienia knura. Wykazano w nich, że dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) jest głównym enzymem antyoksydacyjnym w układzie rozrodczym knura. Następnie dokonano izolacji i opisu właściwości biochemicznych tego enzymu [93, 106]. Koziorowska-Gilun i in. [94], pobierając od knurów in vivo (pod narkozą) płyn lub nasienie z różnych miejsc układu rozrodczego, stwierdzili znaczną aktywność SOD w plemnikach pochodzących z ogona najądrza oraz w płynie pobranym z ogona najądrza i prostaty.

Akrosyna jest proteinazą serynową, powstającą z proakrosyny podczas reakcji akrosomowej, typową dla gamet męskich [2]. Glogowski i in. [54], adaptując procedurę oznaczania aktywności akrosyny – stosowaną u ludzi – do badania plemników knura, stwierdzili znacznie większą aktywność tego enzymu u knura niż u człowieka. Uzyskane wyniki potwierdziły przydatność metody do oceny jakości nasienia knura. Całoroczna ocena aktywności akrosyny u knurów pozwoliła wykazać sezonowe zmiany oraz korelację pomiędzy jakością nasienia i aktywnością badanego enzymu w okresie jesienno-zimowym [17].

Kriobiologia nasienia

Z hodowlanego punktu widzenia bardzo ważne jest doskonalenie metod konserwacji nasienia zwierząt użytkowych. Wiąże się to z właściwą oceną przydatności do konserwacji nasienia (pochodzącego od różnych osobników), jak również z miarodajną oceną jego wartości biologicznej przed i po konserwacji.

W ostatnich latach – jako uzupełnienie klasycznych sposobów oceny jakości nasienia – wprowadzane są metody pozwalające określić m.in. stan plazmolemy i chromatyny plemników. Do oceny integralności plazmolemy plemników używa się metod fluorescencyjnych z wykorzystaniem techniki podwójnego barwienia (SYBR-14/jodek propidyny) [45, 51] lub barwnika Hoechst 33258, wiążącego się z DNA, ale nie przechodzącego przez natywne błony komórkowe [42, 44, 45, 214]. Dodatkowo na podstawie testu oporności osmotycznej (ORT – osmotic resistant test) można określić stan plazmolemy w regionie akrosomowym plemnika, testu HOST (hypo-osmotic swelling test) zaś podatność witki plemnika na deformacje [179]. Wprowadzono szereg technik do oceny struktury chromatyny lub DNA plemników, m.in. takich jak: analiza komet (comet assay), test oparty na inkorporacji znakowanej trytem aktynomycyny D (^{3}H-AMD), a także testy: SCSA (sperm chromatin stucture assay), SCD (sperm chromatin dispersion), TUNEL (in-situ nick translation assay) i DBD-FISH (DNA breakage detection-fluorescence in-situ hybridization) [39].

Na podkreślenie zasługuje opracowanie przez Frasera i Strzeżka [47] tzw. neutralnej wersji analizy komet (NCA) do badania zmian struktury DNA plemników knura opartej na procedurze opisanej przez Marty i in. [120]. Następnie metoda ta była używana do oceny DNA plemników przechowywanych w temperaturze 5° i 16°C [47], jak i kriokonserwowanych [45, 46]. Do oceny stabilności chromatyny plemników knura stosowano test SCSA, wykorzystujący cytometrię przepływową [157], oraz test oparty o inkorporację ^{3}H-AMD [46, 187, 188].

Kriokonserwacja nasienia knura stwarza problemy technologiczne ze względu na gatunkowo specyficzne cechy plazmolemy plemników (stosunkowo niską zawartość cholesterolu i wysoki udział nienasyconych kwasów tłuszczowych), które m.in. zwiększają ich podatność na udary osmotyczne i chłodowe oraz sprzyjają peroksydacji lipidów błonowych, prowadzącej do fragmentacji nienasyconych kwasów tłuszczowych. W technologii kriokonserwacji nasienia knurów, krytycznym momentem jest także szybka penetracja glicerolu do plemników, która może uszkodzić plazmolemę i spowodować „wyciek" enzymów akrosomu i wstawki do środowiska zewnętrznego. Wymienione właściwości przyczyniają się do wystąpienia w plemnikach knura zmian kriogenicznych podczas konserwacji, znacznie obniżających ich wartość biologiczną [182, 186]. Celowe jest zatem prowadzenie dalszych badań zmierzających do opracowania wysokosprawnej technologii kriokonserwacji nasienia knurów.

Zapoczątkowane w ośrodku poznańskim badania nad kriokonserwacją nasienia knura dotyczyły poszukiwania rozcieńczalników, w których plemniki zachowują wysoką ruchliwość po zamrożeniu-rozmrożeniu nasienia oraz opracowania metody

inseminacji loch mrożonym nasieniem knura [116]. Efektem tych badań było uzyskanie, po raz pierwszy w Polsce, prosiąt po inseminacji loch kriokonserwowanym nasieniem knura [117].

Przełomowym faktem w zakresie konserwacji nasienia knura było opracowanie tzw. „kortowskiej" metody jego zamrażania [185]. Stwierdzono jednak, że wartość biologiczna nasienia knura ulega znacznemu obniżeniu zarówno podczas jego konserwacji w stanie płynnym, jak i kriokonserwacji. Słaba efektywność biologiczna stosowanych technologii skłoniła do rozwinięcia badań podstawowych dotyczących molekularnych zmian struktur plemników poddanych działaniu niskich temperatur. Opracowano procedurę wzbogacania standardowego rozcieńczalnika Kortowo-3 (K-3), zamiast pełnym żółtkiem jaja kurzego, lipoproteinami izolowanymi z żółtka jaja kurzego (LPFh) lub strusia afrykańskiego (LPFo) [182]. Generalnie stwierdzono, że dodatek frakcji lipoprotein do rozcieńczalnika nasienia knura stabilizuje pH [182], zwiększa oporność plemników na udary chłodowe [43], ma korzystny wpływ na tlenowy i beztlenowy metabolizm plemników konserwowanych w temperaturze 5°C [41], a także zmniejsza stopień degradacji DNA plemników [47].

Obecnie prowadzone badania w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie zmierzają m.in. do oceny przydatności do kriokonserwacji pełnego ejakulatu knura lub gęstej jego frakcji oraz nasienia poddanego dializie przed zamrożeniem, a także do opracowania systemu osłaniającego plemniki podczas ekwilibracji i zamrażania, z wykorzystaniem pełnego żółtka jaja kury (HEY) lub frakcji lipoproteinowej żółtka jaja strusia (LPFo) [182].

Stwierdzono, między innymi, że kriokonserwacja pełnego ejakulatu knura w rozcieńczalnikach z dodatkiem HEY lub LPFo zdecydowanie obniża odsetek plemników wykazujących destabilizację chromatyny [46]. Z kolei, dializa nasienia przed jego zamrożeniem, poprawia jakość plemników po rozmrożeniu, co przejawia się lepszą stabilnością plazmolemy, zwłaszcza w regionie wstawkowym, oraz wysokim odsetkiem plemników ruchliwych [40].

W ośrodku wrocławskim prowadzone były badania dotyczące adaptacji różnych oryginalnych technologii kriokonserwacji nasienia knura z uwzględnieniem sposobów konfekcjonowania i składowania plemników w ciekłym azocie [6, 8] oraz dodatku do świeżego nasienia przed kriokonserwacją dimeru lizozymu [7]. Badania te zmierzają do zaproponowania praktyce hodowlanej najskuteczniejszej metody mrożenia i formy konfekcjonowania plemników knura.

Doskonaleniu technologii konserwacji nasienia knura w temperaturach dodatnich i ujemnych służą również badania prowadzone w ośrodku szczecińskim [49, 50]. Stosując cytochemiczny test skryningowy na oksydoreduktazy zależne od NADH (diaforazy/NADH), wykazano niekorzystny wpływ „efektu rozrzedzania" oraz czasu przechowywania nasienia w stanie płynnym na zdolności oksydoredukcyjne mitochondriów plemników knura [49]. Stwierdzono także, iż użycie wody o wysokiej czystości, otrzymanej metodą odwróconej osmozy zamiast wody destylowanej, do przygotowania rozcieńczalnika BTS ma korzystny wpływ na jakość przechowywa-

nego nasienia, określaną m.in. na podstawie integralności akrosomów, aktywności AspAT oraz ruchliwości i zdolności zapładniającej plemników [50].

Nasienie knura różni wiele wyznaczników ilościowych i jakościowych od nasienia innych gatunków zwierząt użytkowych. Wyjątkowa podatność plemników knura na udary chłodowe i osmotyczne stanowi główną przyczynę ograniczonego wykorzystywania nasienia kriokonserwowanego do inseminacji loch. Prezentowane efekty badawcze polskich i światowych ośrodków naukowo-badawczych dowodzą, że dalszy postęp technologii konserwacji nasienia knura, a zwłaszcza kriokonserwacji, uzależniony jest od kompleksowego rozpoznania czynników, które warunkują zachowanie żywotności i płodności plemników podczas stosowania procedur laboratoryjnych. W ostatnim okresie zwraca się szczególną uwagę na genetycznie uwarunkowane czynniki, które – jak się wydaje – są przyczyną osobniczego zróżnicowania przydatności nasienia knurów do kriokonserwacji. Niezwykle atrakcyjne dla praktyki inseminacyjnej są także badania dotyczące proteomiki nasienia knura, a zwłaszcza tzw. białek płodnościowych występujących w plazmie nasienia. Badania z tego zakresu są również prowadzone w polskich placówkach naukowych.

Przedstawiony przegląd badań dotyczących procesów rozrodczych u świń, wykonanych w Polsce w okresie ostatnich 30 lat, nie jest pełny z powodu ograniczonej objętości opracowania. Mimo to można stwierdzić, że zakres tych badań był bardzo szeroki. Tematyka ich z reguły odnosiła się do aktualnych w danym czasie problemów badawczych, a niekiedy je wyprzedzała. Zdecydowana większość uzyskanych wyników została opublikowana w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, stanowiąc zauważalny udział w ogólnoświatowym dorobku badawczym z tego zakresu.

Literatura

[1] Aitken R.J. 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev*. 6: 19–24.

[2] Baba T., Kashiwabara S., Watanabe K., Itoh H., Michikawa Y., Kimura K., Takada M., Fukamizu A., Arai Y. 1989. Activation and maturation mechanisms of boar acrosin zymogen based on the deduced primary structure. *J. Biol. Chem.* 264: 11920–11927.

[3] Barb C.R., Barrett J.B., Wright J.T., Kraeling R.R., Rampacek G.B. 1990. Opioid modulation of LH secretion by pig pituitary cells in vitro. *J. Reprod. Fertil*. 90: 213–219.

[4] Barb C.R., Kraeling R.R. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim. Reprod. Sci*. 82–83: 155–167.

[5] Bazer F.W., Thatcher W.W. 1977. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F2alpha by the uterine endometrium. *Prostaglandins* 14: 397–400.

[6] Bielas W. 1996. Ocena jakości nasienia knura zamrażanego w słomkach. *Medycyna Wet*. 52: 258–260.

[7] Bielas W., Dubiel A., Niżański W. 2003. Wpływ dimeru lizozymu na jakość konserwowanego w niskich temperaturach nasienia knura. *Medycyna Wet.* 59: 259–262.

[8] Bielas W., Dubiel A., Niżański W. 2003. Wpływ metod konserwacji oraz form konfekcjonowania na jakość plemników knura po rozmrożeniu. *Medycyna Wet*. 59: 172–175.

[9] Bogacka I., Siawrys G., Okrasa S., Kaminski T., Przala J. 2002. The influences of GnRH, oxytocin and vasoactive intestinal peptide on LH and PRL secretion by porcine pituitary cells in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.* 53: 439–451.

[10] Bonet S., Briz M., Fradera A. 1991. The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies. *Scientia gerundensis* 17: 77–84.

[11] Brzezińska-Ślebodzińska E., Ślebodziński A.B., Pietras B., Wieczorek G. 1995. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace Elem. Res.* 47: 69–74.

[12] Calvete J.J., Solis D., Sanz L., Diaz-Maurino T., Schafer W., Mann K., Topfer-Petersen E. 1993. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *Eur. J. Biochem.* 218: 719–725.

[13] Calvete J.J., Solis D., Sanz L., Diaz-Maurino T., Topfer-Petersen E. 1994. Glycosylated boar spermadhesin AWN-1 isoforms. Biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites, and effect of glycosylation on ligand binding. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375: 667–673.

[14] Carnahan K.G., Prince B.C., Mirando M.A. 1996. Exogenous oxytocin stimulates uterine secretion of prostaglandin F2 alpha in cyclic and early pregnant swine. *Biol. Reprod*. 55: 838–843.

[15] Ciereszko A., Glogowski J., Demianowicz W., Strzeżek J. 1992. Low stability of aspartate aminotransferase in boar semen. *Theriogenol*. 37: 1269–1281.

[16] Ciereszko A., Jabłonowska C., Strzeżek J. 1990. Aspartate aminotransferase activity in motile and immotile spermatozoa fractions of frozen-thawed boar semen obtained after filtration on columns filled with chitin. *Anim. Reprod. Sci*. 23: 237–244.

[17] Ciereszko A., Ottobre J.S., Glogowski J. 2000. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim. Reprod. Sci*. 64: 121–126.

[18] Ciereszko A., Strzeżek J. 1989. Isolation and characteristics of aspartate aminotransferase from boar semen. *Int. J. Biochem.* 21: 1343–1351.

[19] Ciereszko R., Dusza L. 1993. Exogenous prolactin elevates plasma progesterone concentrations and reduces androgen concentrations during the early luteal phase of the porcine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 31: 141–154.

[20] Ciereszko R., Opalka M., Kaminska B., Gorska T., Dusza L. 2003. Prolactin signalling in porcine theca cells: the involvement of protein kinases and phosphatases. *Reprod. Fertil. Dev.* 15: 27–35.

[21] Ciereszko R., Opalka M., Kaminska B., Kaminski T., Dusza L. 2002. Prolactin involvement in the regulation of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis during the early luteal phase of the porcine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 99–115.

[22] Ciereszko R.E., Petroff B.K., Ottobre A.C., Guan Z., Stokes B.T., Ottobre J.S. 1998. Assessment of the mechanism by which prolactin stimulates progesterone production by early corpora lutea of pigs. *J. Endocrinol*. 159: 201–209.

[23] Cox N.M., Britt J.H. 1982. Pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone to lactating sows: endocrine changes associated with induction of fertile estrus. *Biol. Reprod.* 27: 1126–1137.

[24] Czeczot H., Strzeżek J. 1986. Heterogenność deoksyrybonukleaz układu rozrodczego buhaja i knura. *Medycyna Wet*. 42: 291–294.

[25] Dubiel A., Stanczyk J.F., Karpiakowa C., Kotonski B., Bakonska-Pacon E., Sobiech K.A. 1989. Effect of adrenergic drugs and exploitation on sexual reflexes and semen properties in Polish large white boars aged 2–3 years. *Pol. Arch. Weter*. 29: 143–154.

[26] Dusza L., Ciereszko R. 2007. Regulacja sekrecji gonadotropin i prolaktyny oraz ich oddziaływanie na tkanki docelowe.W: Fizjologiczna regulacja rozrodu u samic pod red. Tadeusza Krzymowskiego, Wydawnictwo UWM, Olsztyn-Kortowo (w druku).

[27] Dusza L., Ciereszko R., Okrasa S., Kotwica G. 1993. Prolactin administration during the follicular phase of cyclic sows. *Anim. Reprod. Sci*. 34: 147–158.

[28] Dusza L., Dobroszyńska T., Jana B., Sobczak J., Milczarek R., Okrasa S., Kałamarz H., Zezula-Szpyra A. 1992. Melatonin effects on morphology of ovaries and in vitro GnRH release in prepubertal gilts. 12th International Congress on Animal Reproduction, the Hague 1992, Congress Proceedings 2: 942–944.

[29] Dusza L., Krzymowska H. 1979. Plasma prolactin concentrations during the oestrous cycle of sows. *J. Reprod. Fertil*. 57: 511–514.

[30] Dusza L., Krzymowska H. 1981. Plasma prolactin levels in sows during pregnancy, parturition and early lactation. *J. Reprod. Fertil*. 61: 131–134.

[31] Dusza L., Okrasa S., Ciereszko R., Kotwica G., Tilton J.E. 1988. Endocrine changes associated with spontaneous luteolysis in sows. I. Temporal relationship among prolactin, prostaglandin F2alpha, progesteron and LH. *Anim. Reprod. Sci.* 17: 115–122.

[32] Dusza L., Opałka M., Kaminska B., Kaminski T., Ciereszko R. 1996. The relationship between electrical resistance of vaginal mucus and plasma hormonal parameters during periestrus in sows. *Theriogenol*. 45: 1491–1503.

[33] Dusza L., Sobczak J., Jana B., Murdza A., Bluj W. 1991. Zastosowanie Biolactinu-2 (oczyszczona prolaktyna świni) do stymulacji laktacji u loch. *Medycyna Wet*. 47: 418–421.

[34] Esbenshade K.L. 1991. Passive immunization of the pig against gonadotropin releasing hormone during the follicular phase of the estrous cycle. *Theriogenol*. 35: 869–881.

[35] Esbenshade K.L., Britt J.H. 1985. Active immunization of gilts against gonadotropin-releasing hormone: effects on secretion of gonadotropins, reproductive function, and responses to agonists of gonadotropin-releasing hormone. *Biol. Reprod*. 33: 569–577.

[36] Estienne M.J., Barb C.R. 2005. The control of adenohypophysial hormone secretion by amino acids and peptides in swine. *Domest. Anim. Endocrinol*. 29: 34–42.

[37] Fitko R., Kucharski J., Szlezyngier B., Jana B. 1996. The concentration of GnRH in hypothalamus, LH and FSH in pituitary, LH, PRL and sex steroids in peripheral and ovarian venous plasma of hypo- and hyperthyroid, cysts-bearing gilts. *Anim. Reprod. Sci*. 45: 123–138.

[38] Franczak A., Ciereszko R., Kotwica G. 2005. Oxytocin (OT) action in uterine tissues of cyclic and early pregnant gilts: OT receptors concentration, prostaglandin F(2)alpha secretion, and phosphoinositide hydrolysis. *Anim. Reprod. Sci.* 88: 325–339.

[39] Fraser L. 2004. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol. J. Vet. Sci.* 7: 311–321.

[40] Fraser L., Dziekonska A., Strzezek R., Strzezek J. 2007. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenol*. 67: 994–1003.

[41] Fraser L., Gorszczaruk K., Lecewicz M., Strzezek J. 2003. Age-related changes and seasonal variations in boar sperm metabolism during liquid storage at 5° and 16°C. *J. Anim. Feed. Sci*. 12: 803–811.

[42] Fraser L., Gorszczaruk K., Strzeżek J. 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim.* 36: 325–329.

[43] Fraser L., Lecewicz M., Krasicki R., Strzezek J. 2002. Effect of extender composition and storage temperatures on motility of preserved boar semen. *J. Anim. Feed. Sci.* 11: 661–669.

[44] Fraser L., Lecewicz M., Strzezek J. 2002. Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol. J. Vet. Sci.* 5: 85–92.

[45] Fraser L., Strzeżek J. 2005. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod. Domest. Anim.* 40: 530–536.

[46] Fraser L., Strzezek J. 2007. Is there a relationship between chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing thawing? *Theriogenol*. (w druku).

[47] Fraser L., Strzeżek J. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem. Cytobiol*. 42: 49–55.

[48] Fraser L., Wysoki P., Strzeżek J. 1997. Antiandrogenic action of cyproterone acetate (CPA); morphological and biochemical changes in the boar semen. *Polish J. Endocrinol*. 48: 89–98.

[49] Gaczarzewicz D., Piasecka M., Udala J., Blaszczyk B., Laszczynska M., Kram A. 2003. Oxidoreductive capability of boar sperm mitochondria in fresh semen and during their preservation in BTS extender. *Reprod. Biol*. 3: 161–172.

[50] Gaczarzewicz D., Udala J. 2002. The effect of water used for making BTS extender on the quality of boar semen stored. *Ann. Anim. Sci*. Suppl. 2: 113–118.

[51] Garner D.L., Johnson L.A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53: 276–284.

[52] Gączarzewicz D., Udała J., Lasota B., Błaszczyk B. 2000. Kształtowanie się wybranych wskaźników oceny jakościowej i biochemicznej nasienia knurów eksploatowanych w zakładzie unasieniania zwierząt. *Zesz. Nauk. Przegl. Hod. „Chów i hodowla trzody chlewnej"* 48: 93–97.

[53] Glogowski J., Danforth D.R., Ciereszko A. 2002. Inhibition of alkaline phosphatase activity of boar semen by pentoxifylline, caffeine, and theophylline. *J. Androl*. 23: 783–792.

[54] Glogowski J., Demianowicz W., Piros B., Ciereszko A. 1998. Determination of acrosin activity of boar spermatozoa by the clinical method: optimization of the assay and changes during short-term storage of semen. *Theriogenol.* 50: 861–872.

[55] Glogowski J., Strzeżek J. 1987. Immunological and biochemical properties of alkaline phosphatase in boar epididymal fluid. *Biol. Immunol. Reprod*. 13: 91–94.

[56] Glogowski J., Strzeżek J. 1985. Immunological and biochemical properties of alkaline phosphatase in boar epididymal fluid. *Am. J. Reprod. Immunol. and Microbiol.* 7: 68.

[57] Grazul A., Przala J., Wiesak T., Muszynska A. 1987. Action of GnRH on steroid secretion by luteal cells of cyclic and early pregnant sows in vitro. *Acta. Vet. Hung*. 69: 203–210.

[58] Gregoraszczuk E., Bilińska B., Okólski A., Bielański W. 1982. Luteotytic effects of PGF2 on cells from porcine corpora lutea gron in tissue culture. *Zool. Jb. Anat*. 107: 197–204.

[59] Gregoraszczuk E., Ptak A., Wojciechowicz T., Nowak K.W. 2006. Action of IGF-I on expression of the long form of the leptin receptor (ObRb) in prepubertal time and throughout the estrous cycle in the mature pig ovary. *Reprod. Nutr. Devel*. (w druku).

[60] Gregoraszczuk E., Stoklosowa S., Duda M., Slomczynska M. 1996. Does ovarian granulosa and theca cell interaction in co-culture affect the cytoplasmic microtubule organization? *Cytobios* 88: 133–140.

[61] Gregoraszczuk E.L., Ptak A. 2005. In vitro effect of leptin on growth hormone (GH)- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-stimulated progesterone secretion and apoptosis in developing and mature corpora lutea of pig ovaries. *J. Reprod. Dev*. 51: 727–733.

[62] Gregoraszczuk E.L., Ptak A., Wojtowicz A.K., Gorska T., Nowak K.W. 2004. Estrous cycle-dependent action of leptin on basal and GH or IGF-I stimulated steroid secretion by whole porcine follicles. *Endocr. Regul*. 38: 15–21.

[63] Gregoraszczuk E.L., Slomczynska M. 1998. Beta-endorphin inhibition of progesterone secretion by porcine granulosa cells during follicle development. *Reprod. Nutr. Dev*. 38: 227–234.

[64] Gregoraszczuk E.L., Stoklosowa S. 1997. The effect of microtubule and microfilament-disrupting drugs on prolactin-stimulated progesterone synthesis and secretion by cultured porcine theca cells. *Acta Histochem*. 99: 207–215.

[65] Grzegorzewski W.J., Skipor J., Wasowska B., Krzymowski T. 1997. Countercurrent transfer of ^{125}I-LHRH in the perihypophyseal cavernous sinus-carotid rete vascular complex, demonstrated on isolated pig heads perfused with autologous blood. *Domest. Anim. Endocrinol*. 14: 149–160.

[66] Happola O., Lakomy M., Yanaihara N. 1989. Met5-enkephalin- and Met5-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-immunoreactive nerve fibers in the pig female reproductive system. *Neurosci. Lett.* 101: 156–162.

[67] Holody D., Strzezek J. 1999. Heparin-and Zn^{2+}-binding proteins from boar seminal plasma. *Acta Biochim. Pol*. 46: 935–939.

[68] Hołody D., Strzeżek J., Kordan W., Torska J. 1996. Multifunction of Zn^{2+}-dependent glycoprotein complex from boar seminal vesicle glands. *Reprod. Domest. Anim*. 31: 243–244.

[69] Jacyno E., Kołodziej A., Kawęcka M., Pietruszka A., Delikator B. 2006. Wpływ dodatku L-karnityny na jakość nasienia knurów. Konferencja Naukowa „Praktyczne możliwości wykorzystania osiągnięć z biotechnologii w rozrodzie zwierząt gospodarskich", Szczecinek 2006, Streszczenia Prac: 92.

[70] Kalamarz H. 1999. Wpływ neuropeptydu Y, substancji P, galaniny i β-endorfiny na uwalnianie LHRH z wyniosłości pośrodkowej loszek podczas indukowanego wyrzutu LH. Praca doktorska, Wydział Bioinżynierii, UWM Olsztyn.

[71] Kaminski T. 2005. Intercellular changes in porcine granulosa cells following treatment with opioid agonist, FK 33-824. *Anim. Reprod. Sci*.

[72] Kaminski T. 2004. The response of phospholipase C/protein kinase C and adenylyl cyclase/protein kinase A pathways in porcine theca interna cells to opioid agonist FK 33-824. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27: 379–396.

[73] Kaminski T., Gawronska B., Derecka K., Okrasa S., Przala J. 2000. Gene expression and peptide localization for LH/hCG receptor in porcine small and large luteal cells: possible regulation by opioid peptides. *J. Physiol. Pharmacol*. 51: 359–368.

[74] Kaminski T., Okrasa S., Bogacka I., Siawrys G., Przala J. 2001. Porcine theca cells produce immunoreactive beta-endorphin and change steroidogenesis in response to opioid agonist. *Acta Vet. Hung*. 49: 319–329.

[75] Kaminski T., Siawrys G., Bogacka I., Okrasa S., Przala J. 2004. The influence of opioid peptides on steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Reprod. Domest. Anim*. 39: 25–32.

[76] Kaminski T., Siawrys G., Bogacka I., Okrasa S., Przala J. 2003. The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 71–84.

[77] Kaminski T., Siawrys G., Bogacka I., Przala J. 2000. The physiological role of beta-endorphin in porcine ovarian follicles. *Reprod. Nutr. Dev*. 40: 63–75.

[78] Kamniski T. 2005. Wpływ opioidów na steroidogenezę w komórkach ziarnistych I osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych świń; mechanizm działania agonisty opioidowego FK 33-824. *Post. Biol. Kom*. 3: 477–493.

[79] Kemp B. 1991. Nutritional strategy for optimal semen production in boars. *Pig News and Information* 12: 555–558.

[80] Kemp B., Bakker G.C.M., Den Hartog L.A., Verstegen M.W.A. 1991. The effect of semen collection frequency and food intake on semen production in breeding boars. *Anim. Prod*. 22: 87–98.

[81] Kineman R.D., Leshin L.S., Crim J.W., Rampacek G.B., Kraeling R.R. 1988. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the forebrain of the pig. *Biol. Reprod*. 39: 665–672.

[82] Kochman K., Przekop F., Okrasa S. 2007. Ośrodkowa regulacja neuralna procesów rozrodczych. W: Fizjologiczna regulacja rozrodu u samic pod red. Tadeusza Krzymowskiego, Wydawnictwo UWM, Olsztyn-Kortowo (w druku).

[83] Kolodziejczyk J., Gregoraszczuk E.L., Leibovich H., Gertler A. 2001. Different action of ovine GH on porcine theca and granulosa cells proliferation and insulin-like growth factors I- and II-stimulated estradiol production. *Reprod. Biol*. 1: 33–41.

[84] Kordan W. 2000. Properties of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) from boar seminal plasma (In Polish). *Dissertations and Monographs, University of Warmia and Mazury in Olsztyn* 44: 1–53.

[85] Kordan W., Holody D., Eriksson B., Fraser L., Rodriguez-Martinez H., Strzeżek J. 1998. Boar seminal vesicle glands motility inhibiting factor (SMIF) – a plasmatic peptide with multifunctional biochemical effects on boar spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim*. 33: 347–354.

[86] Kordan W., Mollova M.V., Ivanova M., Hołody D., Georgieva R., Strzeżek J. 1999. Immunolocalization and binding characteristics of boar seminal plasma glycoprotein (Gp-54) and its component – the sperm motility inhibiting factor (SMIF). *Anim. Sci. Pap. Rep*. 17: 49–57.

[87] Kordan W., Strzeżek J. 2002. Effect of platelet-activating factor on motility parameters and plasmalemma integrity of boar spermatozoa. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 20: 37–45.

[88] Kordan W., Strzeżek J., Fraser L. 2003. Functions of platelet actvating factor (PAF) in mammalian reproductive processes: a minireview. *Pol. J. Vet. Sci*. 6: 55–60.

[89] Kotwica G., Dusza L., Ciereszko R., Okrasa S. 1991. Evidence for relaxin and progesterone synchronous secretion on days 13 to 17 of the oestrous cycle in sows. *Exp. Clin. Endocrinol*. 98: 3–8.

[90] Kotwica G., Dusza L., Ciereszko R., Okrasa S., Schams D. 1990. Oxytocin plasma levels during spontaneous and cloprostenol-induced luteolysis in sows. *Anim. Reprod. Sci*. 22: 109–119.

[91] Kotwica G., Franczak A., Kurowicka B. 2007. Regulacja sekrecji oksytocyny i wazopresyny oraz mechanizm ich działania w tkankach docelowych. W: Fizjologiczna regulacja rozrodu u samic pod red. Tadeusza Krzymowskiego, Wydawnictwo UWM, Olsztyn-Kortowo (w druku).

[92] Kotwica G., Staszkiewicz J., Skowronski M.T., Siawrys G., Bogacka I., Franczak A., Kurowicka B., Krazinski B., Okrasa S. 2006. Effects of oxytocin alone and in combination with selected hypothalamic hormones on ACTH, beta-endorphin, LH and PRL secretion by anterior pituitary cells of cyclic pigs. *Reprod. Biol*. 6: 115–131.

[93] Kowalówka M., Wysocki P., Fraser L., Strzeżek J. 2007. Extracellular superoxide dismutase (SODEX) from boar seminal plasma. *Reprod. Domest. Anim*. (w druku).

[94] Koziorowska-Gilun M., Kowalówka M., Koziorowski M., Strzeżek J. 2006. Antioxidant status of spermatozoa of cauda epididymis and fluids of accessory sex glands of boar. *Acta Biochim. Pol*. 53 (Suppl. 1): 129.

[95] Kraeling R.R., Barb C.R. 1990. Hypothalamic control of gonadotrophin and prolactin secretion in pigs. *J. Reprod. Fertil*. Suppl. 40: 3–17.

[96] Kraeling R.R., Barb C.R., Leshin L.S., Rampacek G.B. 1992. Central nervous system peptide and amino acid modulation of luteinizing hormone and prolactin secretion in the pig. *J. Physiol. Pharmacol*. 43: 79–103.

[97] Kraszewska O., Nynca A., Petroff B.K., Wąsowska B., Pawłowska A., Ciereszko R.E. 2006. Involvement of environmental estrogens in the regulation of granulosa cell function in pigs. XV Międzynarodowe Sympozjum Polskiej Sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN pt. Molekularne i Fizjologiczne aspekty Regulacji Ustrojowej, Krakow, Book of Abstracts: 266–268.

[98] Krzymowski T., Czarnocki J., Koziorowski M., Kotwica J., Stefańczyk S. 1986. Counter current transfer of ^{3}H-PGF$_{2\alpha}$ in the mesometrium: A possible mechanism for prevention of luteal regression. *Anim. Reprod. Sci*. 11: 259–272.

[99] Krzymowski T., Grzegorzewski W., Stefanczyk-Krzymowska S., Skipor J., Wasowska B. 1999. Humoral pathway for transfer of the boar pheromone, androstenol, from the nasal mucosa to the brain and hypophysis of gilts. *Theriogenol.* 52: 1225–1240.

[100] Krzymowski T., Kotwica J., Okrasa S., Doboszynska T., Ziecik A. 1978. Luteal function in sows after unilateral infusion of PGF-2alpha into the anterior uterine vein on different days of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil*. 54: 21–27.

[101] Krzymowski T., Kotwica J., Stefanczyk S., Czarnocki J., Debek J. 1982. A subovarian exchange mechanism for the countercurrent transfer of ovarian steroid hormones in the pig. *J. Reprod. Fertil*. 65: 457–465.

[102] Krzymowski T., Skipor J., Grzegorzewski W. 1992. Cavernosus sinus and carotid rete of sheep and sows as a possible place for countercurrent exchange of some neuropeptides and steroid hormones. *Anim. Reprod. Sci*. 29: 225–240.

[103] Krzymowski T., Stefanczyk-Krzymowska S. 2004. The oestrous cycle and early pregnancy – a new concept of local endocrine regulation. *Vet. J.* 168: 285–296.

[104] Krzymowski T., Stefańczyk-Krzymowska S. 2007. The role of the endometrium in endocrine regulation of the animal oestrous cycle. *Reprod. Domest. Anim*. (w druku).

[105] Krzysztofowicz A., Stoklosowa S. 1977. Ultrastructure of theca interna cells of porcine ovarian follicle. *Anat. Histol. Embryol*. 6: 359–364.

[106] Kuklińska M., Strzeżek J. 2004. Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) jako podstawowy enzym antyoksydacyjny nasienia knura. XII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Nauka praktyce", Warszawa 2004, Streszczenia: 69.

[107] Kumar M.S., Becker T., Ebert K. 1991. Distribution of substance P, GnRH, Met-enkephalin in the central nervous system of the pig. *Brain Res. Bull*. 26: 511–514.

[108] Lakomy M., Kotwica J., Calka J., Kaleczyc J. 1986. The effect of oestradiolum benzoicum and progesterone on the noradrenalin content in organs of the female reproductive system of sexually immature pigs. *Gegenbaurs Morph. Jahrb*. 132: 129–143.

[109] Lasota B., Udała J., Gączarzewicz D. 2000. Związki między zawartością kadmu i ołowiu w nasieniu i krwi knurów a jakością ich nasienia. *Zesz. Nauk. Przegl. Hod. „Chów i hodowla trzody chlewnej"* 48: 41–50.

[110] Leshin L.S., Kraeling R.R., Barb C.R., Rampacek G.B. 1992. Associated luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone secretion in ovariectomized gilts. *Domest. Anim. Endocrinol.* 9: 77–88.

[111] Li W.I., Jiao S., Chin P.P. 1993. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in porcine reproductive tissues. *Peptides* 14: 543–549.

[112] Lopez F.J., Merchenthaler I.J., Moretto M., Negro-Vilar A. 1998. Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol. Neurobiol*. 18: 125–146.

[113] Louis G.F., Lewis A.J., Weldon W.C., Ermer P.M., Miller P.S., Kittok R.J., Stroup W.W. 1994. The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci*. 72: 2051–2060.

[114] Louis G.F., Lewis A.J., Weldon W.C., Miller P.S., Kittok R.J., Stroup W.W. 1994. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72: 2038–2050.

[115] Luberda Z., Strzeżek J., Bielski A. 1988. Wpływ zawartości cynku w plazmie nasienia knura na aktywność DNaz i fosfataz oraz właściwości precypitujące tego płynu wobec żółtka jaja kurzego. *Medycyna Wet*. 44: 298–301.

[116] Łyczyński A. 1971. Zamrażanie nasienia knurów w rozcieńczalnikach glikozo-żółtkowo-glicerolowych. *Medycyna Wet*. 27: 738–740.

[117] Łyczyński A. 1977. Zdolność zapładniająca mrożonego nasienia knura. *Medycyna Wet*. 33: 296–298.

[118] Majewska M., Panasiewicz G., Majewski M., Szafrańska B. 2006. Localization of chorionic Pregnancy-Asociated Glycoprotein family in the pig. *Reprod. Biol.* 6: 205–230.

[119] Marin-Guzman J., Mahan D.C., Chung Y.K., Pate J.L., Pope W.F. 1997. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci*. 75: 2994–3003.

[120] Marty M.S., Singh N.P., Holsapple M.P., Gollapudi B.B. 1999. Influence of p53 zygosity on select sperm parameters of the mouse. *Mutat. Res*. 427: 39–45.

[121] Matsuo H., Baba Y., Nair R.M., Arimura A., Schally A.V. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 43: 1334–1339.

[122] McCann S.M., Kimura M., Walczewska A., Karanth S., Rettori V., Yu W.H. 1998. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15: 333–344.

[123] Mirando M.A., Prince B.C., Tysseling K.A., Carnahan K.G., Ludwig T.E., Hoagland T.A., Crain R.C. 1995. A proposed role for oxytocin in regulation of endometrial prostaglandin F2 alpha secretion during luteolysis in swine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 395: 421–433.

[124] Mohamed O.A., Jonnaert M., Labelle-Dumais C., Kuroda K., Clarke H.J., Dufort D. 2005. Uterine Wnt/beta-catenin signaling is required for implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 102: 8579–8584.

[125] Nynca A., Ciereszko R.E. 2006. Effect of genistein on steroidogenic response of granulosa cell populations from porcine preovulatory follicles. *Reprod. Biol.* 6: 31–50.

[126] Ogoński T., Skólmowska M., Kopczyński P. 2006. Pomiar potencjału antyoksydacyjnego plazmy nasienia knurów metodą FRAP. Konferencja Naukowa „Praktyczne możliwości wykorzystania osiągnięć z biotechnologii w rozrodzie zwierząt gospodarskich", Szczecinek 2006, Streszczenia Prac: 94.

[127] Okrasa S. 1997. Udział opioidów w regulacji wydzielania LH u świń w różnych okresach aktywności płciowej. *Endokrynol. Pol*. 48 (Supl. 5): 1–69.

[128] Okrasa S., Kałamarz H., Zięcik A.J. 1995. Gonadotrophin-releasing hormone release in vitro from the stalk median eminence of cyclic and ovariectomized gilts in response to naloxone or morphine. *Anim. Reprod. Sci*. 40: 151–163.

[129] Okrasa S., Skowronski M.T., Staszkiewicz J., Kotwica G., Lakomy M., Ziecik A.J. 2003. The effects of estradiol on beta-endorphin, GnRH and galanin content in the oviduct and the uterus of ovariectomized gilts. *Reprod. Biol*. 3: 63–80.

[130] Oponowicz A., Franczak A., Kurowicka B., Kotwica G. 2006. Relative transcript abundance of oxytocin receptor gene in porcine uterus during luteolysis and early pregnancy. *J. Appl. Genet*. 47: 345–351.

[131] Panasiewicz G., Majewska M., Romanowska A., Dajnowiec J., Szafranska B. 2006. Radiocompetition of secretory pregnancy-associated glycoproteins as chorionic ligands with luteal and uterine gonadotrophin receptors of pregnant pigs. *Anim. Reprod. Sci.* (w druku).

[132] Panasiewicz G., Majewska M., Szafranska B. 2004. Trophoblastic cDNA cloning of porcine Pregnancy-Associated Glycoprotein genes (pPAG) and in silico analysis of coded polypeptide precursors. *Reprod. Biol*. 4: 131–141.

[133] Plucienniczak G., Jagiello A., Plucienniczak A., Holody D., Strzezek J. 1999. Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 52: 303–309.

[134] Polkowska J., Liwska J., Dubois M.P. 1985. Ontogeny of neuropeptidergic systems: luteinizing hormone releasing hormone (LHRH); somatostatin (SRIF) and neurophysin (NF) in the hypothalamus of the domestic pig by immunocytochemistry. *Folia Histochem. Cytobiol.* 23: 193–200.

[135] Przala J. 1987. Regulacja funkcji sekrecyjnej komórek jajnika świń w czasie cyklu estralnego, ciąży i ciąży rzekomej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln*. 339: 187–213.

[136] Przala J., Grazul A., Wiesak T., Muszynska A., Dusza L. 1985. Steroid hormones and prolactin in porcine follicular fluid in estrous cycle and early pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol*. 86: 291–296.

[137] Przala J., Kaminski T., Okrasa S., Siawrys G., Bogacka I. 2001. The content of beta-endorphin-like immunoreactivity in porcine corpus luteum and the potential roles of progesterone, oxytocin and prolactin in the regulation of beta-endorphin release from luteal cells in vitro. *Reprod. Domest. Anim*. 36: 107–112.

[138] Przala J., Kaminski T., Siawrys G., Okrasa S. 1999. Large luteal cells are the source of immunoreactive beta-endorphin in the pig: effects of HCG and TNFA on its secretion by luteal cells in vitro. *Endocr. Regul*. 33: 117–123.

[139] Przała J., Kamiński T. 2007. Sekrecyjna czynność jajnika w cyklu rujowym. W: Fizjologiczna regulacja rozrodu u samic pod red. Tadeusza Krzymowskiego, Wydawnictwo UWM, Olsztyn-Kortowo (w druku).

[140] Przała J., Kamiński T., Bogacka I., Siawrys G. 1996. The role of opioids in porcine corpus luteum function. *J. Physiol. Pharmacol*. 47 (Supl. 1): 101–110.

[141] Ptak A., Gregoraszczuk E. 2003. Growth hormone and insulin-like growth factor-I action on progesterone secretion by porcine corpora lutea isolated at various periods of luteal phase. *Acta Vet. Hung*. 51: 197–208.

[142] Ptak A., Kajta M., Gregoraszczuk E.L. 2004. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured luteal cells collected from early, mature, and regressing porcine corpora lutea. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 267–279.

[143] Retterstol K., Haugen T.B., Tran T.N. 2001. Studies on the metabolism of essntial fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction* 121: 881–887.

[144] Schally A.V., Arimura A., Baba Y., Nair R.M., Matsuo H., Redding T.W., Debeljuk L. 1971. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 43: 393–399.

[145] Scott C.J., Tilbrook A.J., Rawson J.A., Clarke I.J. 2000. Gonadal steroid receptors in the regulation of GnRH secretion in farm animals. *Anim. Reprod. Sci*. 60–61: 313–326.

[146] Siawrys G., Bogacka I., Okrasa S., Kaminski T., Przala J. 2002. The effect of stimulators and blockers of adrenergic receptors on LH secretion and cyclic nucleotide (cAMP and cGMP) production by porcine pituitary cells in vitro. *Anim. Reprod. Sci*. 69: 73–89.

[147] Siawrys G., Bogacka I., Okrasa S., Kaminski T., Przala J. 2003. The effects of GnRH and adrenergic agents on PRL and beta-endorphin secretion by porcine pituitary cells in vitro. *Acta Vet. Hung*. 51: 353–369.

[148] Siawrys G., Kamiński T., Smolińska N., Gajewska A., Okrasa S., Kochman K., Przała J. 2005. Leptin and its role in implantation process. The 4th Symposium of the Society for Biology Reproduction and Joint Polish-Japanese Seminar „Cutting-edge Reproductive Physiology – Regulation of Ovarian Function", Kraków 2005, Book of Abstracts.

[149] Skipor J., Grzegorzewski W., Wasowska B., Krzymowski T. 1997. Counter current transfer of beta-endorphin in the perihypophyseal cavernous sinus-carotid rete vascular complex of sheep. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105: 308–313.

[150] Skipor J., Wąsowska B., Grzegorzewski W., Zezula-Szpyra A., Stefańczyk-Krzymowska S., Thiery J.C. 2001. Transfer of dopamine by counter-current mechanism in the ewes changes with endocrine stage. *Biogenic Amines* 16: 431–445.

[151] Skowronski M.T., Nielsen S. 2006. Expression of aquaporins in female reproductive tract of pig. *J. Physiol. Pharmacol*. 57(2): 226.

[152] Slomczynska M., Gregoraszczuk E., Kochman K., Stoklosowa S. 2001. Prolactin binding analysis and immunohistochemical localization of prolactin receptor in porcine ovarian cells. *Endocr. J*. 48: 71–80.

[153] Slomczynska M., Pierzchala-Koziec K., Gregoraszczuk E., Maderspach K., Wierzchos E. 1997. The kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: localization in granulosa cells. *Cytobios* 92: 195–202.

[154] Slomczynska M., Szoltys M., Duda M., Tabarowski Z., Sakiewicz A. 2006. Androgen receptor in the reproductive systems of pregnant pigs and rats. *Reprod. Biol*. 6 Suppl 1: 113–118.

[155] Smolińska N., Przała J., Kamiński T., Siawrys G. 2006. Ekspresja genu leptyny i jej receptora w macicy i trofoblaście świń w okresie wczesnej ciąży. XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki 2006, Materiały Zjazdowe: 102.

[156] Smolińska N., Przała J., Siawrys G., Kamiński T. 2006. Ekspresja genu leptyny i jej receptora w jajniku świń w okresie wczesnej ciąży. XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki 2006, Materiały Zjazdowe, str. 101.

[157] Smorąg Z., Bochenek M., Gajda B., Gogol P., Jura J., Skrzyszowska M., Szczęśniak-Fabiańczyk B., Trzcinska M. 2006. Nowe metody biotechnologiczne w rozrodzie świń. Konferencja Naukowa „Praktyczne możliwości wykorzystania osiągnięć z biotechnologii w rozrodzie zwierząt gospodarskich", Szczecinek 2006, Streszczenia Prac, str. 61.
[158] Staszkiewicz J., Skowronski M., Siawrys G., Kamniski T., Krazinski B.E., Plonka K.J., Wylot B., Okrasa S. 2007. Expression of proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin genes in porcine luteal cells. Acta. Vet. Hung. 55 (w druku).
[159] Staszkiewicz J., Skowronski M.T., Kaminski T., Siawrys G., Krazinski B.E., Kusmider M., Przala J., Okrasa S. 2006. Expression of proopiomelanocortin, proenkephalin and prodynorphin genes in porcine theca and granulosa cells. *Anim. Reprod. Sci*. (w druku).
[160] Staszkiewicz J., Wylot B., Okrasa S. 2006. Ekspresja genów kodujących POMC i receptor μ w przysadce podczas cyklu rujowego u loszek. II Zjazd Polskiego Towarzystwa Neuroendokrynologii, Warszawa 2006, Streszczenia Prac: 69.
[161] Stefanczyk-Krzymowska S., Chlopek J., Grzegorzewski W., Radomski M. 2005. Local transfer of prostaglandin E2 into the ovary and its retrograde transfer into the uterus in early pregnant sows. *Exp. Physiol*. 90: 807–814.
[162] Stefanczyk-Krzymowska S., Grzegorzewski W., Skipor J., Wasowska B., Krzymowski T. 1997. Involvement of adrenoceptors in the ovarian vascular pedicle in the regulation of counter current transfer of steroid hormones to the arterial blood supplying the oviduct and uterus of pigs. *Br. J. Pharmacol*. 120: 763–768.
[163] Stefanczyk-Krzymowska S., Krzymowski T., Einer-Jensen N., Kamiński T., Kotwica J. 1990. Local transfer prostaglandin F2α from the uterine lumen into the venous and arterial blood and into the uterine, mesometrial and ovarian tissue on Day 18 of pregnancy in the pig. *Anim. Reprod. Sci*. 23: 223–235.
[164] Stefanczyk-Krzymowska S., Krzymowski T., Grzegorzewski W., Wasowska B., Skipor J. 2000. Humoral pathway for local transfer of the priming pheromone androstenol from the nasal cavity to the brain and hypophysis in anaesthetized gilts. *Exp. Physiol*. 85(6): 801–809.
[165] Stefanczyk-Krzymowska S., Krzymowski T., Wasowska B., Chlopek J. 2002. Retrograde transfer of ovarian steroid hormones to the ovary in the porcine periovarian vascular complex. *Exp. Physiol*. 87: 361–371.
[166] Stefanczyk-Krzymowska S., Wasowska B., Chlopek J., Gilun P., Grzegorzewski W., Radomski M. 2006. Retrograde and local destination transfer of uterine prostaglandin E2 in early pregnant sow and its physiological consequences. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 81: 71–79.
[167] Stefańczyk-Krzymowska S., Skipor J., Grzegorzewski W., Wąsowska B., Krzymowski T. 1994. Local increase of steroid hormone concentrations in blood supplying the uterus and oviduct in anaesthetized and conscious gilts. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 35–41.
[168] Stefańczyk-Krzymowska S., Wąsowska B., Chłopek J., Grzegorzewski W. 2004. Retrograde transfer of steroid hormones to the ovary in luteal and follicular phase of porcine oestrous cycle in vivo. *Exp. Physiol*. 89: 1–5.
[169] Stepien A., Shemesh M., Ziecik A.J. 1999. Luteinising hormone receptor kinetic and LH-induced prostaglandin production throughout the oestrous cycle in porcine endometrium. *Reprod. Nutr. Dev.* 39: 663–674.
[170] Stoklosowa S. 1989. The interaction of follicular cells and steroidogenic activity of the ovary. *Acta Physiol. Pol.* 40: 35–52.
[171] Stoklosowa S. 1982. Tissue culture of gonadal cells. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung*. 33: 367–379.
[172] Stoklosowa S., Bahr J., Gregoraszczuk E. 1978. Some morphological and functional characteristics of cells of the porcine theca interna in tissue culture. *Biol. Reprod*. 19: 712–719.
[173] Stoklosowa S., Gregoraszczuk E. 1984. Interakcja komórek osłonki wewnętrznej i warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego oraz komórek małych i dużych ciałka żółtego w sekrecji hormonów sterydowych i ich odpowiedź na egzogenne hormony gonadotropowe. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol*. 309: 49–70.
[174] Stoklosowa S., Gregoraszczuk E., Channing C.P. 1982. Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulosa cells. *Biol. Reprod*. 26: 943–952.
[175] Stoklosowa S., Gregoraszczuk E., Holeckova E., Michl J. 1981. Enhanced multiplication and progesterone production by porcine granuloma cells cultured in a serum-free medium. *Exp. Cell Res*. 131: 431–435.
[176] Stoklosowa S., Gregoraszczuk E.L., Zabaglo L. 1996. LHRH – modulator of progesterone and estradiol secretion by theca and granulosa cells on porcine follicle in mono- and co-culture. *Endocr. Regul*. 30: 45–50.
[177] Stoklosowa S., Stadnicka A. 1973. Corpus luteum cells grown as monolayers. *Experientia* 29: 1041–1042.
[178] Stokłosowa S., Szołtys M. 1978. Hormonal activity of cultured ovarian cells as measured by RIA. Proceedings of the 3d International Congress of Immunology of of Reproduction, Bulgarian Academy of Sciences and the WHO, Sofia Bulgaria: 813–815
[179] Strzezek J. 2000. Technologiczne problemy użytkowania rozpłodowego knura inseminacyjnego. *Magazyn Weterynaryjny* – Suplement – Świnie: 54–59.
[180] Strzezek J., Demianowicz W., Kordan W., Torska J., Wysocki P., Hołody D. 1996. Biochemical status of boar spermatozoa and seminal plasma before and after a 10-day depletion test. *Reprod. Dom. Anim*. 31: 245–246.
[181] Strzezek J., Fraser L., Demianowicz W., Kordan W., Wysocki P., Holody D. 2000. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. *Theriogenol*. 54: 949–963.

[182] Strzezek J., Fraser L., Dziekonska, Strzezek R., Lecewicz M. 2006. Kompleksowa technologia konserwacji nasienia knura w różnych temperaturach – aspekty poznawcze i aplikacyjne. Konferencja Naukowa „Praktyczne możliwości wykorzystania osiągnięć z biotechnologii w rozrodzie zwierząt gospodarskich", Szczecinek 2006, Streszczenia Prac: 83, wykład.
[183] Strzezek J., Fraser L., Holody D., Wysocki P. 1998. Biochemical properties and usefulness of boar semen for liquid preservation following atropine administration. *Zentralbl Veterinarmed* A 45: 459–470.
[184] Strzezek J., Fraser L., Kuklinska M., Dziekonska A., Lecewicz M. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod. Biol*. 4: 271–287.
[185] Strzezek J., Glogowski J., Hopfer E., Wojtkiewicz K. 1985. „Kortowska" metoda zamrażania nasienia knura. *Medycyna Wet*. 6: 349–353.
[186] Strzezek J., Glogowski J., Magierska E., Luberda Z., Jabłonowska C. 1984. Some aspects of cryobiochemistry of boar semen. Proc. Xth Int. Congr. Anim. Reprod. and A.J., Illinois: 244–246.
[187] Strzezek J., Kordan W. 2003. Effects of decondensing agents on chromatin stability of boar spermatozoa – radioisotope study. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 21: 167–181.
[188] Strzezek J., Kordan W., Glogowski J., Wysocki P., Borkowski K. 1995. Influence of semen-collection frequency on sperm quality in boars, with special reference to biochemical markers. *Reprod. Dom. Anim*. 30: 85–94.
[189] Strzezek J., Sławeta R. 1984. Biochemiczne i morfologiczne zmiany w nasieniu knura podczas przechowywania w temperaturze +15°C do +18°C. *Medycyna Wet*. 40: 495–499.
[190] Strzezek J., Wysocki P., Kordan W., Kuklinska M. 2005. Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod. Biol*. 5: 279–290.
[191] Strzeżek J., Fraser L., Wysocki P., Hołody D., Dobrzyńska B. 1998. Accessory sex glands of boar: inhibition of their secretory activity by antiandrogen cyproterone 266. *Fertilität* 13: 244–250.
[192] Strzeżek J., Hołody D. 1996. Separation of 54 kDa glycoprotein with suppressive properties from boar seminal plasma. *Adv. Contracept. Deliv. Syst.* 12: 235–246.
[193] Strzeżek J., Hopfer E. 1987. Zinc ion-dependent protein in boar semen. I. Egg yolk precipitating activity and some biochemical proteins. *Anim. Reprod. Sci.* 13: 117–131.
[194] Strzeżek J., Hopfer E., Zaborniak A. 1987. Zinc ion-dependent protein in boar seminal plasma. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Anim. Reprod. Sci.* 13: 133–142.
[195] Strzeżek J., Kordan W., Kostyra W., Zaborniak A. 1992. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. *Anim. Reprod. Sci*. 29: 35–42.
[196] Strzeżek J., Kosiniak-Kamysz K., Kuklińska M., Bittmar A., Podstawski Z., Rafalski G. 2000. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in stallion and boar semen. *ESDAR Newsletter* 5: 56.
[197] Strzeżek J., Łapkiewicz S., Lecewicz M. 1999. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Pap. Rep*. 17: 181–188.
[198] Strzeżek J., Saiz-Cidoncha F., Wysocki P., Tyszkiewicz A., Jastrzębski M. 2002. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Anim. Sci. Pap. Rep*. 20: 255–266.
[199] Strzeżek J., Torska J. 2001. Activity of proteinase inhibitors in seminal plasma of vasectomised boars. *Anim. Sci. Pap. Rep*. 19: 111–121.
[200] Szafranska B., Miura R., Ghosh D., Ezashi T., Xie S., Roberts R.M., Green J.A. 2001. Gene for porcine pregnancy-associated glycoprotein 2 (poPAG2): its structural organization and analysis of its promoter. *Mol. Reprod. Dev*. 60: 137–146.
[201] Szafranska B., Panasiewicz G. 2002. The placental expression of the porcine pregnancy-associated glycoprotein (pPAG) gene family examined in situ and in vitro. *Anim. Reprod. Sci*. 72: 95–113.
[202] Szafranska B., Xie S., Green J., Roberts R.M. 1995. Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophectoderm. *Biol. Reprod.* 53: 21–28.
[203] Szafrańska B., Panasiewicz G., Majewska M. 2006. Porcine pregnancy associated glycoproteins family (pPAGs) – as in vitro-produced chorionic ligands for luteal and uterine gonadotropin receptors. *Reprod. Biol*. 6: 105–111.
[204] Szafrańska B., Weigl R.M., Tilton J.E. 1994. Short-term stimulation of luteinizing hormone (LH) secretion by naloxone treatment in the pregnant gilt. *Anim. Reprod. Sci*. 37: 43–50.
[205] Topfer-Petersen E., Calvete J.J., Sanz L., Sinowatz F. 1995. Carbohydrate-and heparin-binding proteins in mammalian fertilization. *Andrologia* 27: 303–324.
[206] Torska J., Strzeżek J. 1995. Proteinase inhibitor of high molecular weight on seminal plasma of boars. *Adv. Contracept. Deliv. Syst*. 11: 217–219.
[207] Udała J., Gączarzewicz D., Błaszczyk B., Drzewiecki R., Chmiel K., Bobiński P. 2006. Właściwości nasienia knurów po zastosowaniu w ich żywieniu odżywczego koncentratu roślinnego (KR) z suszu owoców, warzyw i ziół. Konferencja Naukowa „Praktyczne możliwości wykorzystania osiągnięć z biotechnologii w rozrodzie zwierząt gospodarskich", Szczecinek 2006, Streszczenia Prac: 105.
[208] Uzumcu M., Braileanu G.T., Carnahan K.G., Ludwig T.E., Mirando M.A. 1998. Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F secretion by luminal epithelial, glandular epithelial, and stromal cells from pig endometrium. I. Response of cyclic pigs on day 16 postestrus. *Biol. Reprod.* 59: 1259–1265.

[209] Velev B., Georgieva R., Strzeżek J., Stefanov D., Kordan W. 1992. Immunological activity of sperm motility inhibiting factor isolated from boar seminal plasma. *Anim. Reprod. Sci*. 29: 81–88.

[210] Wacławik A., Blitek A., Kaczmarek M., Zięcik A. 2005. Expression patterns of mPGES-1 and PGFS in pig trophoblast. The 4th Joint Meeting of the UK Fertility Societies, Warwick, UK 2005.

[211] Wąsowicz K., Kaleczyc J., Majewski M., Łakomy M., Zięcik A., Kraeling R.R. 1998. Influence of oestradiol on distribution of VIP-and NPY-positive nerve fibres and VIP and NPY concentrations in the porcine female reproductive tract. *Pol. J. Vet. Sci*. 1: 39–46.

[212] Wiesak T., Przala J., Muszynska A., Hunter M.G. 1990. Effect of catecholamines and FSH on progesterone secretion by pig granulosa cells. *Endocrinol. Exp*. 24: 449–456.

[213] Więsak T., Hunter M.G., Przała J. 1991. Catecholamines regulate the steroidogenesis by luteal cells from early pregnant pig. *Endocr. Reg*. 25: 193–197.

[214] Woelders H. 1988. A novel technique for differential live-dead staining using fluorescence microscopy and fluorimetry. W: Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. AI., Dublin, *Reprod. Domest. Anim*. 4: 579.

[215] Wuttke W., Spiess S., Knoke I., Pitzel L., Leonhardt S., Jarry H. 1998. Synergistic effects of prostaglandin F2alpha and tumor necrosis factor to induce luteolysis in the pig. *Biol. Reprod*. 58: 1310–1315.

[216] Wylot B., Staszkiewicz J., Kraziński B.E., Okrasa S. 2006. Ekspresja genów kodujących prodynorfinę i receptor opioidowy κ w przysadce u loszek podczas cyklu rujowego. II Zjazd Polskiego Towarzystwa Neuroendokrynologii, Warszawa 2006, Streszczenia Prac: 65.

[217] Wysocki P., Strzezek J. 2006. Isolation and biochemical characteristics of a molecular form of epididymal acid phosphatase of boar seminal plasma. *Theriogenol*. 66: 2152–2159.

[218] Wysocki P., Strzezek J. 2003. Purification and characterization of a protein tyrosine acid phosphatase from boar seminal vesicle glands. *Theriogenol*. 59: 1011–1025.

[219] Wysocki P., Strzeżek J. 2000. Molecular forms of acid phosphatase of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Pap. Rep*. 18: 99–106.

[220] Ye X., Hama K., Contos J.J., Anliker B., Inoue A., Skinner M.K., Suzuki H., Amano T., Kennedy G., Arai H., Aoki J., Chun J. 2005. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435: 104–108.

[221] Ziecik A., Krzymowska H., Tilton J.E. 1982. Porcine LH levels during the estrous cycle, gestation, parturition and early lactation. *J. Anim. Sci.* 54: 1221–1226.

[222] Ziecik A., Tilton J.E., Weigl R., Williams G.L. 1982/83. Plasma luteinizing hormone during pregnancy in the pig. *Anim. Reprod. Sci*. 5: 213–218.

[223] Ziecik A., Yearwood H.A., Espana E.F. 1994. Effect of naloxone and morphine on the estradiol induced LH surge in gilts. *Arch. Zootec*. 43: 5–14.

[224] Ziecik A.J., Britt J.H., Esbenshade K.L. 1988. Short loop feedback control of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in pigs. *Endocrinology* 122: 1658–1662.

[225] Ziecik A.J., Esbenshade K.L., Britt J.H. 1989. Effects of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist on gonadotrophin secretion and gonadal development in neonatal pigs. *J. Reprod. Fertil.* 87: 281–289.

[226] Ziecik A.J., Okrasa S., Kalamarz H., Lakomy M., Kraeling R.R. 1999. Concentration of neuropeptide Y, galanin, β-endorphin, vasoactive intestinal peptide and gonadotropin releasing hormone in the hypothalamus of gilts during the estrous cycle. *Neuroendocrinol. Lett*. 20: 397–403.

[227] Ziecik A.J., Sienkiewicz W., Okrasa S., Kałamarz H., Łakomy M., Kraeling R.R. 1999. Concentration and distribution of neuropeptide Y, galanin, β-endorphin, vasoactive intestinal peptide and gonadotrophin-releasing hormone in the hypothalamus of gilts during oestrogen-induced surge secretion of luteinizing hormone. *Reprod. Domest. Anim*. 34: 477–487.

[228] Zięcik A. 1984. Hormony przysadki w regulacji czynności jajnika. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol*. 309: 71–90.

[229] Zięcik A., Bodek G., Ciereszko R., Stępień A., Kotwica G. 2001. Involvement of gonadotropins in induction of luteolysis. *Reprod. Biol*. 1: 33–50.

[230] Zięcik A., Kaczmarek M., Bogacki M. 2007. Oogeneza, zapłodnienie, implantacja zarodka i okres wczesnej ciąży. W: Fizjologiczna regulacja rozrodu u samic pod red. Tadeusza Krzymowskiego, Wydawnictwo UWM, Olsztyn-Kortowo: (w druku).

[231] Zięcik A., Wąsowicz G., Derecka K., Kisielewska J. 1996. Extragonadal gonadotropin receptors in pigs – 1996 update. *J. Physiol. Pharmacol.* 47 (Supl. 1): 29–39.

Progress in the studies concerning reproductive processes in pigs

Key words: pig reproduction, hypothalmamic-pituitary-ovarian axis, reproductive endocrinology, boar semen, seminal plasma proteomic, semen cryobiology

Summary

Paper presents a brief review of literature concerning the reproductive processes in pigs, with special attention paid to the results of research performed in Poland in this area. The regulation of reproductive processes in gilts, including all levels of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and the uterus is presented. Moreover, the molecular aspects of boar reproductive function control are considered in relation to factors influencing sperm production and quality, seminal plasma proteomic and semen cryobiology.

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 95–112

Biologia rozrodu ptaków – osiągnięcia i perspektywy

Janusz Rząsa, Andrzej Sechman,
Helena Elżbieta Paczoska-Eliasiewicz, Anna Hrabia
Katedra Fizjologii Zwierząt,
Akademia Rolnicza im Hugona Kołłątaja w Krakowie,
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
e-mail: rzsechma@cyf-kr.edu.pl

Słowa kluczowe: ptaki, układ rozrodczy, embriogeneza, zapłodnienie in vitro, podwzgórze, przysadka, jajnik, kury mięsne

Rozród ptaków zasadniczo różni się od rozrodu ssaków. Różnice są następujące:

1) samica jest heterogametyczna, ma chromosomy płciowe Z i W, podczas gdy samiec ma parę chromosomów Z;
2) układ rozrodczy samicy jest nieparzysty;
3) u samców w układzie rozrodczym brak dodatkowych gruczołów płciowych;
4) oocyt zawiera dużą ilość żółtka;
5) występuje polispermia;
6) w okresie nieśności owulacje mogą zachodzić dzień po dniu.

Celem niniejszej pracy jest przybliżenie czytelnikowi najnowszych osiągnięć w dziedzinie rozrodu ptaków z uwzględnieniem endokrynnych aspektów regulacji funkcji układu rozrodczego. Główne kierunki badań z zakresu rozrodu ptaków domowych, które można wyodrębnić na podstawie analizy literatury światowej, dotyczą:

1) embriogenezy – stanowiącej model w badaniach procesów związanych m.in. z determinacją płci i różnicowaniem płciowym, organogenezą etc.;
2) zapłodnienia in vitro i procesu transgenezy;
3) funkcji osi podwzgórze-przysadka-jajnik oraz procesów zachodzących w gonadzie podczas dojrzewania płciowego i nieśności;
4) zależności między poziomem żywienia a aktywnością jajnika u kur typu mięsnego.

Na uwagę zasługują również badania dotyczące enzymologii nasienia koguta oraz biochemicznych mechanizmów utrzymywania przedłużonej żywotności plemników w drogach rodnych samicy.

Proces embriogenezy jako model w badaniach procesów determinacji płci i różnicowania płciowego

Poznanie molekularnych mechanizmów determinacji i różnicowania płciowego u kręgowców jest jednym z najbardziej frapujących zagadnień genetyki molekularnej. Nie wszystkie gromady kręgowców mają ten sam, ssaczy (XX:XY) układ chromosomów płciowych. U ptaków płeć zdeterminowana jest układem chromosomów ZZ:ZW, w którym samica jest heterogametyczna (ZW). Rozwój gonad u ptaków stanowi idealny model służący do wyjaśnienia mechanizmów związanych z determinacją płci u kręgowców oraz zagadnień związanych z ewolucją chromosomów płciowych. Dotychczasowe badania porównawcze wykazały, że u poszczególnych gromad kręgowców na kaskadę zdarzeń zachodzących podczas różnicowania płciowego składają się zarówno elementy konserwatywne, jak i specyficzne dla danej gromady. U ptaków np. centralną rolę w różnicowaniu płciowym gonad odgrywają hormony estrogenowe. Jednakże w procesie tym bierze udział szereg czynników transkrypcyjnych kodowanych przez geny uczestniczące w procesie determinacji i różnicowania gonad u ssaków.

U ptaków, podobnie jak u innych kręgowców, jajniki i jądra rozwijają się z tej samej tkanki, zawierającej pierwotne komórki płciowe (PGC), a mieszczącej się w grzebieniu płciowym w rejonie śródnerczy. W początkowym stadium rozwoju (stadium gonady bipotencjalnej) nie ma morfologicznych różnic w budowie gonady u osobników ZZ i ZW. Po zainicjowaniu procesu różnicowania gonady bipotencjalnej, zmienia się wygląd niezróżnicowanej tkanki, a obraz morfologiczny stopniowo staje się charakterystyczny dla obrazu jajnika lub jądra. Układ chromosomów ZW determinuje rozwój lewego jajnika (prawy jajnik degeneruje), a obecność dwóch chromosomów Z prowadzi do rozwoju symetrycznych jąder. U ptaków nie udało się do tej pory wyizolować dominującego genu, który podobnie jak u ssaków (gen *SRY*) decydowałby o determinacji płci. Nie jest jasne, czy determinacja płci zależna jest od dawki genu z chromosomu Z (podwójnej w przypadku samca, a pojedynczej w przypadku samicy), czy od jakiegoś dominującego genu na chromosomie W, determinującego rozwój jajnika [85]. W rozwijających się gonadach ptaków zidentyfikowano natomiast szereg genów autosomalnych (homologicznych do genów ssaczych), które uczestniczą w procesie powstawania, a następnie różnicowania gonady bipotencjalnej. Do najważniejszych z nich należą:

- *SF1* (steroidogenic factor-1), którego ekspresja pojawia się już w 3,5 dniu embriogenezy [97].
- *WT1* (Wilm's tumour-suppressing gene) – ekspresję tego genu stwierdzono w gonadach bipotencjalnych w 4 dniu embriogenezy. Poziom tej ekspresji nie różnił się istotnie w gonadach embrionów ZZ i ZW [98].
- *GATA4* (Gata binding protein) – podobny poziom ekspresji wykazano u embrionów ZZ i ZW w 5,5 dniu embriogenezy [51].

- *SOX9* (SRY-related HMG box gene 9) – ekspresja pojawia się w 6 dniu inkubacji w gonadach embrionów ZZ, w gonadach embrionów żeńskich poziom ekspresji jest bardzo słaby [48].
- *DAX1* (dosage sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia cogenita critical region on the X, gene 1) – zmapowany na chromosomie 1; ekspresja zachodzi przez cały okres różnicowania płciowego w takim samym stopniu w gonadach obu płci [94, 98].
- *AMH* (anti Müllerian hormone) – należy do rodziny transformujących czynników wzrostu (TGF-β). Odpowiedzialny jest za regresję przewodów Müllera, a jego ekspresja pojawia się w gonadach męskich w 5 dniu embriogenezy, a następnie szybko się zwiększa. W gonadzie ZW poziom ekspresji jest bardzo niski [60].

Ponadto na chromosomie Z wykazano obecność najbardziej konserwatywnego w obrębie królestwa zwierząt genu – *DMRT1* (doublesex- and mab-3-related transcription factor 1), który ma domenę DM kodującą regulatorowe białka zaangażowane w kontrolę procesu determinacji płci u bezkręgowców w genach: *dsx* (*Drosophila melanogaster*) i *mab-3* (*Ceanorhabditis elegans*) [59]. Ekspresja genu *DMRT1* pojawia się w grzebieniach płciowych i przewodach Müllera w 3–4 dniu embriogenezy, poprzedza ekspresję genu *AMH*, a jej poziom u embrionów ZZ jest istotnie wyższy niż u ZW [77, 95], co wskazuje, że gen ten jest zaangażowany w rozwój gonady bipotencjalnej do jądra. Z kolei ostatnio na chromosomie W zidentyfikowano dwa geny, które włączone są w proces różnicowania gonady bipotencjalnej do jajnika. Są to gen *WPKCi/ASW* (protein kinase C inhibitor on W chromosome/Avian Sex-specific W-linked) [31, 63] oraz gen *FET-1* (Female Expressed Transcript 1) [79]. Ekspresję genów *WPKCi/ASW* i *FET-1* wykazano już w 3 dniu inkubacji (tj. jeszcze przed rozpoczęciem procesu różnicowania jajnika) w gonadach bipotencjalnych embrionów ZW. Zwiększający się poziom ekspresji obu genów w gonadzie lewej od 4,5 dnia embriogenezy sugeruje, że geny te należą do głównych czynników determinujących rozwój jajnika z gonady bipotencjalnej [96].

Oprócz szeregu genów kodujących czynniki transkrypcyjne w procesie różnicowania płciowego u ptaków uczestniczą również geny kodujące enzymy procesu steroidogenezy. Do najważniejszych, których ekspresja zachodzi począwszy od 4 dnia embriogenezy należą: 17α-hydroksylaza (P450c17) oraz aromataza (P450arom) [108]. P450c17 jest enzymem odpowiedzialnym za przekształcenie pregnenolonu do 17α-hydroksyprogesteronu, a następnie do androstendionu, natomiast P450arom jest podstawowym enzymem konwertującym androgeny do estrogenów (głównie do estradiolu). O ile poziom ekspresji mRNA P450c17 pojawia się w różnicującej się gonadzie bipotencjalnej osobników męskich (ZZ), jak i żeńskich (ZW) już w 5 dniu embriogenezy, o tyle ekspresja P450arom występuje jedynie u osobników ZW i stopniowo wzrasta począwszy od 6 dnia embriogenezy [1, 90]. Przekonujących dowodów na znaczenie P450arom w procesie różnicowania gonady bipotencjalnej u ptaków dostarczyły badania z zastosowaniem selektywnego inhibitora aromatazy (Fadrozolu), który podawany in ovo w 3 dniu embriogenezy prowadzi do maskuli-

nizacji lewej gonady i powstania ovotestis [19]. A zatem zahamowanie aktywności P450arom powoduje u genetycznych samic ZW rewersję płci, która u dojrzałych osobników objawia się występowaniem samczych cech fenotypowych, a powstałe ovotestis przypomina budową tkankę dojrzałego jądra, w której zachodzi proces spermatogenezy. W wyniku tego procesu w ovotestis produkowane są nie tylko plemniki z chromosomem Z, lecz również, nie występujące normalnie w przyrodzie, plemniki z chromosomem W [2]. Wykazano, że plemniki W mają zdolność zapładniania oocytu [2]. Dlatego bardzo interesująco zapowiadają się przyszłe manipulacje in vitro plemnikami W, które po iniekcji do oocytu W mogą dać początek nie występującemu w przyrodzie osobnikowi WW, którego fenotypu możemy się jedynie domyślać.

Zapłodnienie in vitro oraz proces transgenezy

Opracowanie metod hodowli oocytów, zapłodnienia i hodowli zarodków poza organizmem w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych ma ogromne znaczenie w badaniach fizjologicznych, biochemicznych, rozwoju zarodków i uzyskiwaniu ptaków transgenicznych. W ostatnich latach opracowano metodę hodowli pęcherzyków jajnikowych ptaków i ich owulację w warunkach doświadczalnych [64]. Metoda ta pozwala na badanie mechanizmu owulacji, roli hormonów w tym procesie i wykorzystanie oocytów do zapłodnienia in vitro. Po raz pierwszy klasyczne zapłodnienie in vitro oocytów kury pobranych natychmiast po owulacji przeprowadzono ponad 30 lat temu [32]. Na blastodysk nakładano zawiesinę plemników. Zapłodnienie i rozwój embrionów badano histologicznie po 24 h inkubacji. Ostatnio Olszańska i in. [65] uzyskali u przepiórki japońskiej zapłodnienie in vitro oocytów owulowanych pozaustrojowo. Jednak przeprowadzenie zapłodnienia in vitro u ptaków nie jest łatwe, wynika to m.in. z trudności w ustaleniu czasu naturalnej owulacji oraz pozyskaniu oocytów tylko z błoną okołożółtkową. Zastosowanie techniki bezpośredniej iniekcji plemnika do cytoplazmy (ICSI), wydaje się bardziej użyteczną metodą do badania mechanizmu zapłodnienia, roli gamet w tym procesie, a także do produkcji ptaków transgenicznych przez użycie plemników jako wektorów do wprowadzania obcego DNA do oocytu. Po raz pierwszy w 2003 roku dokonano zapłodnienia metodą ICSI u przepiórki japońskiej [34]. Wykazano, że bezpośrednia iniekcja pojedynczego plemnika do oocytu aktywuje oocyt i prowadzi do zapłodnienia, chociaż u ptaków występuje polispermia. Ponadto wydłużone spermatydy i plemniki pobrane z jądra są kompetentne do zapłodnienia, tak jak plemniki pochodzące z nasienia.

Z końcem lat 80. opracowano 3-etapową metodę hodowli embrionów kurzych od stadium jednej komórki do wylęgu w warunkach in vitro [56, 72]. Pierwszy etap obejmuje okres od zapłodnienia (stadium jednej komórki) do wytworzenia blastodermy, czyli okres rozwoju zachodzący naturalnie w jajowodzie. W drugim etapie embriony przenoszone są do skorup zastępczych wypełnionych medium i hodowane przez kolejne 3 doby embriogenezy. Następny etap obejmuje okres wzrostu embrio-

nów od czwartej doby do wylęgu i prowadzony jest w większych skorupach zastępczych w celu wytworzenia komory powietrznej nad embrionem.

Od wielu lat pracuje się nad opracowaniem efektywnej metody uzyskiwania ptaków zmienionych genetycznie (transgenicznych). Celem transgenezy jest produkcja nowych białek terapeutycznych w jaju (jajowód kury jako bioreaktor), ulepszenie genetycznej jakości ptaków, np. odporności na choroby oraz uzyskanie ptaków pozbawionych danego genu (knock out) wykorzystywanych do badania funkcji genów. Metody oparte na mikroiniekcji DNA do zapłodnionego oocytu czy wprowadzaniu egzogennego DNA drogą elektroporacji lub lipofekcji in vivo do embrionów w stadium rozwoju X są nieefektywne, ponieważ egzogenny DNA nie zostaje zintegrowany z DNA chromosomów i ulega degradacji podczas wczesnych etapów rozwoju zarodka [57, 58]. Obecnie najbardziej obiecującą metodą prowadzącą do uzyskania ptaków transgenicznych jest użycie komórek blastodermalnych (BCs) lub pierwotnych komórek płciowych (PGCs) [7, 8, 17, 20, 73, 86, 93, 99]. Zarówno BCs jak i PGCs można hodować in vitro, zamrażać i wprowadzać egzogenny DNA np. na drodze elektroporacji czy lipofekcji. W wyniku iniekcji BCs do embrionów biorców będących w stadium rozwoju X uzyskuje się chimery fenotypowe i mniejszy procent chimer płciowych. Natomiast wykorzystując PGCs wprowadza się je do embrionów będących w takim samym stadium rozwoju jak zarodki, od których pochodzą i uzyskuje się chimery płciowe. Chimery używa się dalej do wyprowadzenia linii ptaków transgenicznych lub do biokonserwacji genotypów. Bednarczyk i in. [9] dokonali rekonstrukcji rodzimej rasy kur – zielononóżka kuropatwiana z wykorzystaniem PGCs. Ostatnio w wyniku manipulacji pierwotnymi komórkami zarodkowymi uzyskano wydajne bioreaktory, tj. kury znoszące jaja zawierające ludzkie białko (monoklonalne ludzkie przeciwciało) w białku jaja [109] co daje nadzieje na możliwość masowej produkcji ludzkich białek terapeutycznych.

Funkcja osi podwzgórze-przysadka-jajnik oraz procesy zachodzące w gonadzie podczas dojrzewania płciowego i nieśności

U samic ptaków domowych liczba zniesionych jaj, a co zatem idzie uzyskane wskaźniki reprodukcyjne i wyniki hodowlane, zależą od liczby oocytów powstających w jajniku. Ich powstawanie w głównej mierze uzależnione jest od tempa procesów atrezji, selekcji i różnicowania się pęcherzyków jajnikowych podczas ich wzrostu i rozwoju. Jak już wcześniej wspomniano w początkowej fazie rozwoju embrionalnego kury obecne są obie gonady. Od czwartego dnia inkubacji rozpoczyna się faza różnicowania, w której pod wpływem wielu czynników transkrypcyjnych oraz hormonów płciowych następuje regresja prawego jajnika i jajowodu prowadząca do rozwoju lewej części układu rozrodczego. Procesy te powodują, że u dojrzałej niosącej kury funkcjonuje jedynie lewy jajnik i jajowód.

Kura domowa osiąga dojrzałość płciową w 20–22 tyg. życia i w tym czasie rozpoczyna okres nieśności. Jaja znoszone są początkowo nieregularnie z przerwami trwającymi 2 dni lub więcej; niekiedy w ciągu jednego dnia znoszonych jest więcej niż jedno jajo. W początkowej fazie nieśności, jaja mogą wykazywać odchylenia od wzorca, np. jaja o miękkiej skorupce lub z podwójnym żółtkiem. Okres taki może trwać nawet około 2 tyg. W czasie 6 do 10 tyg. od rozpoczęcia produkcji jaj, kury wchodzą w okres szczytowej nieśności. Później nieśność zaczyna się stopniowo obniżać (ok. 40–50 tyg. nieśności), a następnie drastycznie spada i kura rozpoczyna okres pierzenia się. Kura znosi jaja w seriach, po których następuje przerwa trwająca 1 lub kilka dni. U młodych kur jaja znoszone są w seriach liczących nawet 30 jaj, natomiast starsze kury znoszą jaja w krótkich seriach – ok. 4–6 jaj w serii [38].

Jajnik niedojrzałego płciowo ptaka składa się z tysięcy małych pęcherzyków, z których ok. 2 tys. można zobaczyć gołym okiem. Z pęcherzyków tych jedynie nieliczne (250–500) wchodzą w fazę przedowulacyjnego wzrostu i w okresie dojrzałości płciowej podlegają owulacji. W dojrzałym jajniku kury, wyróżnić można zrąb jajnika (stromę) z pęcherzykami <1 mm oraz trzy populacje pęcherzyków jajnikowych: 1) białe o średnicy od 1–8 mm; 2) żółte o średnicy 8–35 mm oraz 3) poowulacyjne. Na kilka dni przed osiągnięciem dojrzałości płciowej jeden z grupy białych pęcherzyków podlegając selekcji wchodzi w fazę szybkiego wzrostu, przechodząc do grupy żółtych pęcherzyków przedowulacyjnych. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej w jajniku niosącej kury wyróżnia się ok. 5–7 dużych żółtych pęcherzyków o średnicy od 20–40 mm, które znajdują się w wyraźnej hierarchii, a oznaczane są od największego jako F1, F2 itd. Pęcherzykiem owulującym jest największy pęcherzyk przedowulacyjny F1, natomiast kolejny w hierarchii owuluje ok. 24 h po owulacji pęcherzyka F1 [21, 37, 38].

Pęcherzyk jajnikowy kury składa się z koncentrycznych warstw tkanek, które ściśle otaczają oocyt wypełniony żółtkiem. I tak, od zewnątrz można wyróżnić następujące warstwy: 1) nabłonek z luźną tkanką łączną, 2) osłonkę tekę zewnętrzną, 3) osłonkę wewnętrzną, 4) błonę podstawną i 5) warstwę ziarnistą (granulozę). Warstwy te są dość jednorodne na całej powierzchni pęcherzyka, z wyjątkiem stigmy – miejsca, w którym pęcherzyk przedowulacyjny pęka podczas owulacji. Podczas wzrostu pęcherzyka rozwój oocytu zostaje zatrzymany w profazie pierwszego podziału mejotycznego, a zakończony 4–6 h przed owulacją. Komórki granulozy w białych pęcherzykach prehierarchicznych są bardzo ściśle upakowane w kilku warstwach. Podczas fazy szybkiego wzrostu średnica pęcherzyka zwiększa się, co powoduje zmianę kształtu komórek granulozy, które zaczynają tworzyć pojedynczą warstwę. Między komórkami ziarnistymi tworzą się połączenia i przestrzenie, aby ułatwić transport składników żółtka do oocytu. Pomimo drastycznego wzrostu obwodu pęcherzyka, następuje jedynie nieznaczna proliferacja komórek ziarnistych, która koncentruje się wokół tarczki zarodkowej [6, 102]. Błona podstawna pęcherzyka kury ma w przybliżeniu 1 μm grubości i składa się z kolagenu, glikoprotein i fibronektyn,

ponadto inne komponenty osadzone są na sąsiadujących warstwach teki i granulozy. Produkcja i sekrecja fibronektyny regulowana jest przez gonadotropiny i hormony gonad [16].

Mimo pewnych odrębności anatomicznych, układ podwzgórzowo-przysadkowy ptaków funkcjonuje w podobny sposób jak u ssaków. Przysadka mózgowa położona jest u podstawy mózgu w bezpośredniej bliskości podwzgórza. Układ neurosekrecyjny podwzgórza za pośrednictwem układu wrotnego podwzgórzowo-przysadkowego przekazuje do przysadki gruczołowej hormony uwalniające. Narządem neurohormonalnym jest wyniosłość przyśrodkowa (eminentia mediana), której neurony jądra nadwzrokowego i przykomorowego syntetyzują i wydzielają gonadoliberyny: cGnRH-I i cGnRH-II, z których pierwsza w stosunku do „ssaczego" GnRH jest [Glu^{8}]-GnRH, natomiast druga – [His^{5}-Tryp^{7}-Tyr^{8}]-GnRH [49, 55]. W 2000 r. w podwzgórzu kury zidentyfikowano minogowy GnRH-III [10], natomiast z podwzgórza przepiórki japońskiej – gonadostatynę (GnIH), hormon hamujący uwalnianie obu gonadotropin z przysadki mózgowej [104]. Dotychczasowe badania wskazują, że hormonem stymulującym wydzielanie gonadotropin z przysadki mózgowej jest cGnRH-I, cGnRH-II pełni prawdopodobnie rolę neurotransmitera [76, 89]. Rola minogowego GnRH-III w uwalnianiu gonadotropin z przysadki mózgowej nie jest w pełni wyjaśniona. Hormonami produkowanymi w części gruczołowej przysadki mózgowej są hormon folikulotropowy (FSH) i luteinizujący (LH), których stężenie we krwi wykazuje zarówno dobowe jak i sezonowe zmiany, co związane jest z długością dnia świetlnego. Pomiędzy długością dnia a aktywnością wydzielniczą przysadki mózgowej istnieje dodatnia korelacja, dlatego bodźce świetlne wykorzystywane są w produkcji drobiarskiej w celu stymulacji funkcji osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Hormony gonadotropowe szczególną rolę odgrywają w końcowej fazie dojrzewania płciowego, która u kur typu nieśnego przypada na okres od 15 do 20 tygodnia życia. W okresie tym następuje stopniowy wzrost aktywności układu podwzgórzowo-przysadkowego, a wydzielane z przysadki FSH i LH stymulują wzrost białych, a następnie żółtych pęcherzyków jajnikowych [38, 105, 106]. Oprócz dodatniego wpływu na wzrost pęcherzyków hierarchicznych, LH działa na największe pęcherzyki przedowulacyjne stymulując ich funkcję steroidogenną, a przede wszystkim indukuje owulację [38]. Przedowulacyjny wyrzut LH do krwi występuje 6–4 h przed owulacją [24]. Wykazano, iż obydwie gonadotropiny wpływają na procesy zachodzące podczas wzrostu i rozwoju pęcherzyków jajnikowych; FSH wpływa na wzrost białych pęcherzyków, podczas gdy LH reguluje wzrost i dojrzewanie żółtych pęcherzyków hierarchicznych i wywołuje owulację [40, 71, 100]. Przysadkowe FSH i LH regulują proliferację i produkcję progesteronu (uważanego za marker różnicowania) w przedowulacyjnych pęcherzykach. FSH wpływa na mniej dojrzałe pęcherzyki (F5–F3), a LH oddziałuje na bardziej dojrzałe pęcherzyki (F2 i F1). Wewnątrzjajnikowy czynnik wzrostu EGF, produkowany przez tarczkę zarodkową, pobudza wzrost i zapobiega atrezji pęcherzyka, stymulując proliferację granulozy. Jednocześnie EGF zapobiega

przedwczesnemu dojrzewaniu pęcherzyka, tj. opóźnia różnicowanie [26]. Wykazano, że przedowulacyjny wyrzut LH z przysadki wywoływany jest na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy progesteronem, produkowanym głównie przez największy pęcherzyk przedowulacyjny F1, a LH [106]. Po owulacji w jajniku pozostaje kielichowaty pęcherzyk poowulacyjny, którego aktywność steroidogenna utrzymuje się przez kilka dni [3].

Pęcherzyki jajnikowe kury są głównym źródłem hormonów steroidowych: gestagenów, androgenów i estrogenów we krwi [62, 74, 75]. Głównym gestagenem jest progesteron (P_4), syntetyzowany przez warstwę ziarnistą pęcherzyków przedowulacyjnych [6]. Androgeny (w tym testosteron – T) i estrogeny (estradiol – E_2) produkowane są w warstwie osłonki wszystkich pęcherzyków jajnikowych [47, 101]. Wykazano, że pęcherzyki prehierarchiczne nie są zdolne do produkcji progesteronu, gdyż w komórkach warstwy ziarnistej brak jest aktywności enzymu odszczepiającego boczny łańcuch cholesterolu ($P450_{SCC}$) [101]. W pęcherzykach hierarchicznych sytuacja jest odwrotna. W momencie wejścia pęcherzyka w hierarchię, następuje aktywacja genu kodującego $P450_{SCC}$ w komórkach warstwy ziarnistej pęcherzyka, zwiększa się aktywność enzymu $P450_{SCC}$, co zapoczątkowuje syntezę pregnenolonu, który następnie pod wpływem dehydrogenazy 3β-hydroksysteroidowej (3β-HSD) przekształcany jest do progesteronu [61].

Podczas wzrostu pęcherzyka obserwuje się stopniowy wzrost syntezy P_4, tak iż największy pęcherzyk przedowulacyjny (F1) produkuje prawie wyłącznie ten hormon [6]. Osłonka białych i żółtych pęcherzyków jest miejscem syntezy estradiolu. W białych pęcherzykach proces ten zachodzi głównie drogą Δ^5 poprzez dehydroepiandrosteron (DHEA), który następnie pod wpływem 3β-HSD przekształcany jest do androstendionu. Natomiast w osłonce pęcherzyków hierarchicznych proces ten przebiega drogą Δ^4 poprzez progesteron, który przekształcany jest do androstendionu przez enzym 17α-hydroksylazę ($P450_{17\alpha}$). Powstały androstendion przekształcany jest do testosteronu przez dehydrogenazę 17β-hyedroksysteroidową (17β-HSD), a następnie transportowany do komórek osłonki zewnętrznej, gdzie pod wpływem aromatazy (P450arom) konwertowany jest do estradiolu [35, 36, 53, 62, 74]. Podczas wzrostu pęcherzyka w warstwie osłonki obserwuje się stopniowy spadek syntezy i sekrecji estradiolu [38, 50]. Wyraźne zmiany stężenia P_4 i E_2 w rosnących pęcherzykach jajnikowych obserwuje się już w okresie dojrzewania płciowego. Rząsa i in. [82] wykazali, że w 15. tyg. życia kurek stroma jajnika zawiera 81% P_4 i 78% E_2, natomiast pozostała ilość tych hormonów znajduje się w białych pęcherzykach. Z kolei w 19. tyg. (tj. w momencie rozpoczęcia nieśności) w stromie jajnika znajduje się jedynie 6% P_4 i 39% E_2, w białych pęcherzykach 3% P_4 i 14% E_2, a w pęcherzykach żółtych aż 91% P_4 i 47% E_2. Obserwowane zmiany dystrybucji hormonów płciowych w pęcherzykach jajnikowych dojrzewających ptaków są przede wszystkim wynikiem stopniowego wzrostu aktywności warstwy ziarnistej rosnących pęcherzyków. Odzwier-

ciedleniem zwiększającej się aktywności steroidogennej żółtych pęcherzyków jest stopniowy wzrost poziomu obu hormonów we krwi dojrzewających kurek [70, 87].

Zarówno w okresie dojrzewania płciowego jak i nieśności funkcja jajnika regulowana jest głównie przez hormony gonadotropowe (LH i FSH). Wykazano, że zarówno LH jak i FSH wpływają na proces steroidogenezy pęcherzykowej [25, 35, 67, 68, 84, 88]. W oddziaływaniu gonadotropin i hormonów steroidowych na procesy zachodzące podczas wzrostu, dojrzewania i regresji pęcherzyków jajnikowych pośredniczy wiele substancji określanych ogólnie wewnątrzjajnikowymi regulatorami. Wiele danych literaturowych wskazuje, że substancje te należą do aktywnych regulatorów procesu steroidogenezy, a ich receptory znajdują się w komórkach warstwy ziarnistej i osłonki pęcherzyka. W ostatnich latach w jajniku kury zidentyfikowano szereg hormonów i substancji, które wpływają na procesy zachodzące podczas wzrostu i rozwoju pęcherzyka jajnikowego, a są to m.in.: prostaglandyny [91], wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) [44], aminy biogenne: katecholaminy, serotonina i histamina [68, 83], czynnik wzrostowy insulinopodobny I i II (IGF-I i IGF-II) [67], czynnik wzrostu naskórka (EGF) [26,107], inhibiny i aktywiny [45, 54], fibronektyna [4], białko StAR [43], trójjodotyronina (T3) [84, 88], prolaktyna [33], leptyna [69, 70], grelina [92], adiponektyna [15].

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono badaniom dotyczącym selekcji i atrezji białych pęcherzyków jajnikowych. Mechanizm selekcji pęcherzyków nie jest wyjaśniony, ale sugeruje się, że istotną rolę w tym procesie pełnią FSH i VIP oraz niektóre czynniki wzrostowe (np. IGF-I, EGF). Pod wpływem FSH i VIP w warstwie ziarnistej pęcherzyka pojawia się aktywność enzymu P450scc, odszczepiającego boczny łańcuch cholesterolu [52]. Zwiększenie się ekspresji tego enzymu powoduje, że komórki granulozy stają się kompetentne i rozpoczynają syntezę progesteronu. Po wejściu pęcherzyka w hierarchię spada tempo proliferacji komórek granulozy, a wzrasta proces ich różnicowania się. Szczególną rolę w pęcherzykach hierarchicznych odgrywa tarczka zarodkowa (GD). GD jest źródłem parakrynnych sygnałów niezbędnych do utrzymania pęcherzyka przy życiu, bowiem jej uszkodzenie prowadzi do atrezji pęcherzyków na drodze apoptozy [103]. Wykazano, że proces atrezji białych pęcherzyków zachodzi na drodze apoptozy – programowanej śmierci komórki, który inicjowany jest w warstwie ziarnistej pęcherzyka [37, 39, 40, 101]. W wyniku tego procesu podczas dojrzewania płciowego eliminowanych jest prawie 99% pierwotnych pęcherzyków obecnych w jajniku w momencie wyklucia [38]. W białych pęcherzykach proces apoptozy hamowany jest przez niektóre czynniki podtrzymujące przeżywanie komórek warstwy ziarnistej i stymulujące proces ich proliferacji i różnicowania. Najważniejsze z nich to: FSH i LH [36, 38], VIP [23, 40] oraz niektóre czynniki wzrostowe: IGF-I [40, 67], czynnik wzrostu transformujący α (TGFα) [37, 52], EGF [52, 107] oraz ostatnio odkryta surwiwina [42]. Z kolei do najważniejszych stymulatorów apoptozy należą: czynnik martwicy nowotworu α (TNFα) oraz czynnik indukujący apoptozę (FasL) [11].

Pomimo wykazania obecności wielu czynników pro- i antyapoptotycznych w warstwie ziarnistej pęcherzyków, proces apoptozy w pęcherzykach jajnikowych kury nie jest w pełni wyjaśniony. Należy jednakże podkreślić, iż pęcherzyki jajnika kury, które z łatwością można izolować, stanowią doskonały model wykorzystywany w badaniach dotyczących zjawisk zachodzących podczas wzrostu i rozwoju pęcherzyków. Model ten wykorzystywany jest w badaniach procesu steroidogenezy pęcherzykowej i owulacji [5, 22], apoptozy i proliferacji komórek [37, 38, 39, 40], a także karcynogenezy [41].

Zależność między poziomem żywienia a aktywnością jajnika kur typu mięsnego

U kur typu mięsnego selekcja genetyczna prowadzona w celu zwiększenia masy ciała, a tym samym mięsności, spowodowała, że wraz ze wzrostem tego parametru nastąpił spadek zdolności rozrodczych [78]. Wykazano, że żywienie do woli kur reprodukcyjnych mięsnych prowadzi do odkładania dużych ilości tłuszczu i wysokiej śmiertelności związanej ze schorzeniami mięśni i serca [46], osłabieniem układu immunologicznego [28] i obniżonej płodności [27, 29]. W okresie wzrostu powoduje obniżenie tempa nieśności początkowej, co spowodowane jest spontanicznymi owulacjami wynikającymi z zaburzeń hierarchii pęcherzyków [30]. Konsekwencją wzrostu liczby owulacji u ptaków żywionych do woli jest produkcja jaj o obniżonych parametrach: słaba skorupa, jaja dwużółtkowe, owulacje do jamy ciała [18, 29]. Ilość przyjmowanego pokarmu podczas wychowu oraz masa ciała w momencie uzyskania dojrzałości płciowej skorelowane są z liczbą żółtych pęcherzyków w jajniku kury. Dlatego ograniczanie żywienia jest jednym z podstawowych elementów zmierzających do ograniczenia tempa owulacji w celu uzyskania odpowiedniej aktywności rozrodczej u kur typu mięsnego. Ograniczenie ilości pożywienia w czasie wzrostu istotnie zmniejsza masę jajnika i liczbę dużych pęcherzyków w momencie osiągnięcia dojrzałości płciowej, obniża liczbę spontanicznych owulacji, jaj z defektami i wielu jednoczesnych owulacji [81]. W literaturze anglojęzycznej pojawiło się określenie „broiler breeder paradox" dotyczące niemożności pogodzenia potrzeb produkcyjnych (wysokiej wydajności reprodukcyjnej, dobrej zdrowotności, niskiej śmiertelności kur typu mięsnego i dobrego tempa wzrostu potomstwa) bez zastosowania znacznego ograniczenia poboru paszy [18, 80]. Ograniczone żywienie jest niezbędnym elementem utrzymania zdrowotności niosących ptaków, w celu uzyskania potomstwa zdolnego do szybkiego wzrostu i uzyskania masy rzeźnej w krótkim czasie. Żywienie takie w okresie wzrostu powoduje jednak szereg niekorzystnych zmian w funkcjonowaniu układów hormonalnych [18]. Wykazano, że ilościowe ograniczanie paszy powoduje wzrost stężenia hormonu wzrostu (GH) i tyroksyny (T_4), natomiast spadek stężenia IGF-I i T_3 we krwi [13, 14]. Bruggeman i in. [12] wykazali, że długotrwałe

(od 2 tygodnia życia) ograniczanie ilości podawanej paszy powoduje spadek poziomu GnRH-I w podwzgórzu i gonadotropin (FSH i LH) w przysadce mózgowej, co prowadzi do spowolnienia rozwoju jajnika i jajowodu i opóźnienia nieśności o 6 tygodni. Niektórzy autorzy sugerują, że za różnice w produkcji jaj u ptaków żywionych do woli i ograniczanych odpowiedzialne są zmiany stężenia hormonów osi somatotropowej (GH i IGF-I) oraz osi tarczycowej [13]. Ponieważ wpływ gonadotropin na czynność jajnika jest modulowany przez czynniki wzrostu: IGF, białko morfogenezy kości (BMP) i leptynę, w badaniach podjęto próbę określenia roli tych hormonów jako lokalnych regulatorów funkcji jajnika. Wykazano, iż ograniczenie żywienia stymuluje interakcję między BMP i IGF a gonadotropinami oraz dodatnio wpływa na proliferację komórek warstwy ziarnistej pęcherzyków [66]. Pomimo wykazania pewnych interakcji między czynnikami wzrostu a gonadotropinami różnice w liczbie żółtych pęcherzyków i nieśności kur mięsnych o różnych genotypach nie są w pełni wyjaśnione. Pomimo dużego zainteresowania żywieniem kur mięsnych, w literaturze naukowej nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie dotyczące powiązania żywienia z funkcją rozrodczą i regulacją endokrynną. Wydaje się, iż zastosowanie nowoczesnych metod (np. micro-array i proteomiki) może w sposób istotny przyczynić się do wyjaśnienia tego zagadnienia.

Główne ośrodki i kierunki badań z zakresu rozrodu ptaków w Polsce

1. Katedra Fizjologii Zwierząt AR w Krakowie (prof. dr hab. Janusz Rząsa z zespołem):
   - udział wazotocyny i prostaglandyn w funkcji jajowodu kury;
   - rola amin biogennych w regulacji czynności jajnika i jajowodu kury;
   - opracowanie metody zapłodnienia oocytu przepiórki japońskiej pojedynczym plemnikiem (ICSI);
   - rola hormonów metabolicznych (GH, IGF, leptyna, hormony tarczycy) w czynności jajnika kury domowej w czasie dojrzewania płciowego, nieśności i przerwy w nieśności.
2. Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu (prof. dr hab. Bożenna Olszańska z zespołem):
   - opracowanie metody hodowli i dojrzewania oocytów przepiórki japońskiej in vitro;
   - zapłodnienie in vitro oocytów ptaka owulowanych in vitro;
   - ekspresja genu AA-NAT (aryloalkiloamino-N-acetylotransferazy) warunkującego syntezę melatoniny w trakcie oogenezy i rozwoju zarodkowego przepiórki japońskiej.
3. Katedra Biotechnologii Zwierząt AR w Bydgoszczy oraz Centralny Ośrodek Drobiarstwa IZ (prof. dr hab. Marek Bednarczyk z zespołem):

- opracowanie metody tworzenia chimer ptaków;
- rekonstrukcja rodzimej rasy kur – zielononóżka kuropatwiana z wykorzystaniem pierwotnych komórek płciowych (PGCs);
- wykorzystanie modelu zarodka do stymulacji korzystnego profilu bakteryjnego wylężonych piskląt;
- stymulacja gruczołów wydzielania wewnętrznego, z wykorzystaniem substancji o charakterze antyestrogenowym do przyspieszenia dojrzałości płciowej kogutów.

4. Akademia Rolnicza we Wrocławiu (prof. dr hab. Bronisława Chełmońska z zespołem):
   - badania dotyczące zdolności reprodukcyjnej kogutów i kur Cornish w zależności od metod krycia, sposobu utrzymania i żywienia oraz okresu użytkowania;
   - analiza zmian morfologicznych, biochemicznych oraz zdolności zapładniającej plemników ptaków domowych z nasienia poddanego procesowi kriokonserwacji.
5. Zakład Chemii Ogólnej i Fizjologicznej Uniwersytet Rzeszowski (dr hab. Maria Droba, prof. URz z zespołem):
   - wykazanie obecności kwaśnych glikozydaz w układzie rozrodczym i nasieniu samców ptaków domowych;
   - rola lizosomowych arylosulfataz (kwaśna arylosulfataza A-ASA) w jądrach i plazmie nasienia koguta kury;
   - próba określenia aktywności glikozydaz i ASA w układzie rozrodczym koguta bażanta.
6. Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie (prof. dr hab. Jan Glogowski i prof. dr hab. Andrzej Ciereszko z zespołem):
   - wykazanie obecności i określenie roli enzymów proteolitycznych oraz ich inhibitorów w plazmie nasienia i układzie rozrodczym indora;
   - wpływ sposobu przechowywania nasienia na aktywność amidazy, fragmentację DNA i ruchliwość plemników indora.

Podsumowanie

Za najważniejsze osiągnięcia w rozrodzie ptaków należy uznać: 1) poznanie endokrynnych uwarunkowań rozrodu kur typu nieśnego; 2) uzyskanie w wyniku selekcji linii kur znoszących 330–350 jaj w roku; 3) opanowanie metod manipulacji i konserwacji komórek embrionalnych (pierwotnych komórek płciowych – PGC i komórek blastodermalnych – BC); 4) opracowanie metod zapłodnienia (IVF i ICSI) oraz hodowli oocytów i zarodków ptaków; 5) użycie jajowody kury jako bioreaktora do produkcji ludzkich białek terapeutycznych. Wiele badań z zakresu biologii rozrodu ptaków wykonano w polskich placówkach naukowych lub przez polskich uczonych pracujących na zagranicznych stażach naukowych, a cytowane wcześniej publikacje weszły do kanonu wiedzy z zakresu biologii rozrodu ptaków.

Literatura

[1] Abinawanto, Shimada K., Yoshida K., Saito N. 1996. Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of $P450_{17\alpha}$ and $P450_{arom}$ messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 241–246.

[2] Abinawanto, Zhang C., Saito N., Matsuda Y., Shimada K. 1998. Identification of sperm-bearing female-specific chromosome in the sex-reversed chicken. *J. Exp. Zool.* 280: 65–72.

[3] Armstrong D.G., Davidson M.F., Gilbert A.B., Wells J.W. 1977. Activity of 3-hydroxysteroid dehydrogenase in the postovulatory follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fert*. 49: 253–259.

[4] Asem E.K., Novero R.P. 1994. Stimulation of fibronectin production and deposition by chicken granulosa cells in vitro by epidermal growth factor and transforming growth factor α. *J. Reprod. Fert*. 101: 375–384.

[5] Bahr J. 1990. The avian ovary: model for endocrine studies. *J. Exp. Zool.* Suppl. 4: 192–194.

[6] Bahr J.M., Wang S.C., Huang W.Y., Calvo F.O. 1983. Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol. Reprod*. 29: 326–334.

[7] Bednarczyk M. 2003. Manipulacje komórkami embrionalnymi ptaków. *Biotechnologia* 60: 36–47.

[8] Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M. 2000. Improvement of hatchability of chicken egg injected by blastoderm cells. *Poult. Sci*. 78: 1283–1288.

[9] Bednarczyk M., Łakota P., Słomski R., Pławski A., Lipiński D., Siemieniako D., Lisowski M., Czekalski P., Grajewski B., Dłużniewski P. 2002. Reconstruction of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds. *Poult. Sci*. 81: 1347–1353.

[10] Berghman L.R., D'Handt E., Puebla N., Dees L., Hiney J., Sower S. 2000. Immunocytochemical evidence for the existence of a lamprey luteinizing hormone releasing hormone type III-like peptide in the chicken hypothalamus. *Br. Poult. Sci*. 41: S56–S57.

[11] Bridgham J.T., Johnson A.L. 2001. Expression and regulation of Fas antigen and tumor necrosis factor receptor type I in hen granulosa cells. *Biol. Reprod.* 65: 733–739.

[12] Bruggeman V., D'Hondt E., Berghman L., Onagbesan O., Vanmontfort D., Vandesande F., Decuypere E. 1998. The effect of food intake from 2 to 24 weeks of age on LHRH-I content in the median eminence and gonadotrophin levels in pituitary and plasma in female broiler breeder chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 200–209.

[13] Bruggeman V., Vanmontfort D., Renaville R., Portetelle D., Decuypere E. 1997. The effect of food intake from two weeks of age to sexual maturity on plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and thyroid hormones in female broiler breeder chickens. *Gen. Comp. Endocrinol*. 107: 212–220.

[14] Buyse J., Decuypere E., Darras V.M., Vleurick L.M., Kühn E.R., Veldhuis J.D. 2000. Food deprivation and feeding of broiler chickens is associated with rapid and interdependent changes in the somatotrophic and thyrotrophic axes. *Br. Poult. Sci*. 41: 107–116.

[15] Chabrolle C., Tosca L., Crochet S., Tesserund S., Dupont J. 2006. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol*. (w druku).

[16] Conkright M.D., Asem E.K. 1995. Intercrine role of progesterone in FSH- and cAMP-induced fibronectin production and deposition by chicken granulosa cells: Influence of follicular development. *Endocrinology* 136: 2641–2651.

[17] Czekalski P., Bednarczyk M. 2006. Effect of chimerism on some chosen reproductive parameters of cockerels. *Med. Wet*. 62: 85–88 (in Polish).

[18] Decuypere E., Hocking P.M., Tona K., Onagbesan O., Bruggeman V., Jones E.K.M., Cassy S., Rideau N., Metayer S., Jego Y., Putterflam J., Tesserud S., Collin A., Duclos M., Trevidy J.J., Williams J. 2006. Broiler breeder paradox: a project report. *World's Poult. Sci*. J. 62: 443–453.

[19] Elbrecht A., Smith R. C. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255: 464–469.

[20] Etches R.J., Carsience R.S., Fraser R.M., Clark M.E., Toner A., Verrinder Gibbins A.M. 1993. Avian chimeras and their use in manipulation of the avian genome. *Poult. Sci*. 72: 882–889.

[21] Etches R.J., MacGregor H.E., Morris T.F., Williams J.B. 1983. Follicular maturation in the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fert*. 67: 351–358.

[22] Etches R.J., Pettite J.N. 1990. Reptilian and avian follicular hierarchies: models for the study of ovarian development. *J. Exp. Zool*. Suppl. 4: 112–122.

[23] Flaws J.A., DeSanti A., Tilly K.I., Javid A.N., Tilly J.L. 1995. Vasoactive intestinal peptide-mediated suppression of apoptosis in the ovary: Potential mechanisms of action and evidence of a conserved anti-teratogenic role through evolution. *Endocrinology* 137: 5269–5277.

[24] Furr B.J.A., Bonney R.C., England R.J., Cunningham F.J. 1973. Luteinizing hormone and progesterone in peripheral blood during the ovulatory cycle of the hen *Gallus domesticus*. *J. Endocrinol*. 57: 159–169.

[25] Hammond R.W., Burke W.H., Hertelendy F. 1981. Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulose cells in response to turkey and ovine gonadotropins. *Biol. Reprod*. 24: 1048–1055.

[26] Hernandez A.G., Bahr J.M. 2003. Role of FSH and epidermal growth factor (EGF) in the initiation of steroidogenesis in granulose cells associated with follicular selection in chicken ovaries. *Reproduction* 125: 683–691.

[27] Hocking P.M. 1993. Effects of body weight at sexual maturity and the degree and age of restriction during rearing on the ovarian follicular hierarchy of broiler breeder females. *Br. Poult. Sci*. 34: 793–801.

[28] Hocking P.M. 1996. Role of body weight and food intake after photostimulation on ovarian function at first egg in broiler breeder females. *Br. Poult. Sci*. 37: 841–851.

[29] Hocking P.M., Gilbert A.B., Walker M., Waddington D. 1987. Ovarian follicular structure of White Leghorns fed ad libitum and dwarf and normal broiler breeders fed ad libitum or restricted until point of lay. *Br. Poult. Sci*. 28: 493–506.

[30] Hocking P.M., Waddington D., Walker M.A., Gilbert A.B. 1989. Control of the development of the ovarian follicular hierarchy in broiler breeder pullets by food restriction during rearing. *Br. Poult. Sci*. 30: 161–173.

[31] Hori T., Asakawa S., Itoh Y., Shimizu N., Mizuno S. 2000. Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. *Mol. Biol. Cell* 11: 3645–3660.

[32] Howarth B. Jr. 1971. An examination for sperm capacitation in the fowl. *Biol. Reprod.* 3: 338–341.

[33] Hrabia A., Paczoska-Eliasiewicz H., Rząsa J. 2004. Effect of prolactin on estradiol and progesterone secretion by isolated chicken ovarian follicles. *Folia Biol*. (Kraków) 52: 197–203.

[34] Hrabia A., Takagi S., Ono T., Shimada K. 2003. Fertilization and development of quail oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod*. 69: 1651–1657.

[35] Huang W.Y., Kao K.J., Nalbandov A.V. 1979. Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol. Reprod*. 20: 454–461.

[36] Johnson A.L. 1990. Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *CRC Crit. Rev. Poult. Biol*. 2: 319–346.

[37] Johnson A.L. 1996. The avian ovarian hierarchy: a balance between follicle differentiation and atresia. *Poult. Avian Biol. Rev.* 7: 99–110.

[38] Johnson A.L. 2000. Reproduction in the female. W: Sturkie's Avian Physiology. Red. G. C. Whittow, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: 569–596.

[39] Johnson A.L., Bridgham J.T. 2000. Caspase-3 and -6 expression and enzyme activity in hen granulosa cells. *Biol. Reprod*. 62: 589–598.

[40] Johnson A.L., Bridgham J.T., Witty J., Tilly J.E. 1996. Susceptibility of avian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of BCL-xlong gen expression. *Endocrinology* 137: 2059–2066

[41] Johnson A.L., Giles J.R. 2006. Use of genetic strains in studies of ovarian cancer. *Poult. Sci*. 85: 246–250.

[42] Johnson A.L., Langer J.S., Bridgham J.T. 2002. Survivin as a cell cycle-related and antiapoptotic protein in granulosa cells. *Endocrinology* 143: 3405–3413.

[43] Johnson A.L., Solovieva E.V., Brigham J.T. 2002. Relationship between steroidogenic acute regulatory protein expression and progesterone production in hen granulosa cells during follicle development. *Biol. Reprod*. 67: 1313–1320.

[44] Johnson A.L., Tilly J.L. 1988. Effects of vasoactive intestinal peptide on steroid secretion and plasminogen activator activity in granulosa cells of the hen. *Biol. Reprod*. 38: 296–303.

[45] Johnson P.A. 1997. Avian inhibin. *Poult. Avian Biol. Rev.* 8: 95–106.

[46] Katanbaf M.N., Dunnington E.A., Siegel P.B. 1989. Restricted feeding in early and late-feathering chickens. 1. Growth and physiological responses. *Poult. Sci*. 68: 344–351

[47] Kato M., Shimada K., Saito N., Noda K., Ohta M. 1995. Expression of P450 17α-hydroksylase and P450 aromatase genes in isolated granulosa, theca interna, and theca externa layers of chicken ovarian follicles during follicular growth. *Biol. Reprod*. 52: 405–410.

[48] Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H., Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813–2822.

[49] King J.A., Millar R.P. 1982. Structure of chicken hypothalamic luteinising hormone-relasing hormone I. Structural determination on partially purified material. *J. Biol. Chem*. 257: 10722– 10728.

[50] Kowalski K.I., Tilly J.L., Johnson A.L. 1991. Cytochrome P450 side-chain cleavage ($P450_{scc}$) in the hen ovary. I. Regulation of $P450_{scc}$ messenger RNA levels and steroidogenesis in the theca cells of developing follicles. *Biol. Reprod*. 45: 955–966.

[51] Laverriere A.C., MacNeill C., Mueller C., Poelmann R.E., Burch B.E., Evans T. 1994. Gata 4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem*. 269: 23177–23184.

[52] Li Z., Johnson A.L. 1993. Regulation of P450 cholesterol side-chain cleavage messenger ribonucleic acid expression and progesterone production in hen granulosa cells. *Biol. Reprod*. 49: 463–469.

[53] Li Z., Johnson A.L. 1993. Expression and regulation of cytochrome P450 17-alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid levels and androstendione production in hen granulosa cells. *Biol. Reprod*. 49: 1293–1302.

[54] Lovell T.M., Gladwell R.T., Groome N.P., Knight P.G. 2003. Ovarian follicle development in the laying hen is accompanied by divergent changes in inhibin A, inhibin B, activin A and follistatin production in granulosa and theca layers. *J. Endocrinol*. 177: 45–55.

[55] Miyamoto K., Hasegawa Y., Minegishi T., Nomura M., Igarashi M., Kangawa K., Matsuo H. 1984. Identification of the second gonadotropin-relasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-relasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3874–3878.

[56] Naito M., Nirasawa K., Oishi T. 1990. Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *J. Exp. Zool.* 254: 322–326.

[57] Naito M., Sano A., Tagami T., Harumi T., Matsubara Y. 2000. Efficient transfection of chicken blastoderms in vivo by lipofection and electroporation using green fluorescent protein gene as a marker. *Anim. Sci. J*. 71: 377–385.

[58] Naito M., Sano A., Tagami T., Harumi T., Matsubara Y., Kuwana T. 2002. Efficient gene transfer into early chicken embryos by electroporation of stage X blastoderms in vivo, applying electric pulses vertically to the blastoderm layer. *J. Poult. Sci*. 39: 292–301.

[59] Nanda I., Shan Z., Schartl M., Burt D. W., Koehler M., Nothwang H., Grutzinger F., Paton I. R., Windsor D., Dunn I., Engel W., Staeheli P., Mizuno S., Haaf T., Schmid M. 1999. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat. Genet.* 21: 258–259.

[60] Nishikimi H., Kansaku N., Saito N., Usami M., Ohno Y., Shimada K. 2000. Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Mol. Reprod. Dev*. 55: 20–30.

[61] Nitta H., Mason J.I., Bahr J.M. 1993. Localization of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the chicken ovarian follicle shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation. *Biol. Reprod.* 48: 110–116.

[62] Nitta H., Osawa Y., Bahr J.M. 1991. Multiple steroidogenic cell populations in the theca layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology* 129: 2033–2040.

[63] O'Neill M., Binder M., Smith C., Andrews J., Reed K., Smith M., Millar C., Lambert D., Sinclair A. 2000. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev. Genes Evol*. 210: 243–249.

[64] Olszańska B., Malewska A., Stępińska U. 1996. Maturation and ovulation of Japanese quail oocytes under in vitro conditions. *Br. Poult. Sci*. 37: 929–935.

[65] Olszańska B., Stępińska U., Perry M. M. 2002. Development of embryos from in vitro ovulated and fertilized oocytes of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Exp. Zool*. 292: 580–586.

[66] Onagbesan O.M., Bruggeman V., Van As P., Tona K., Williams J., Decuypere E. 2003. BMPs and BMPRs in chicken ovary and effects of BMP-4 and -7 on granulosa cell proliferation and progesterone production in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E973–E983.

[67] Onagbesan O.M., Vleugels B., Buys N., Bruggeman V., Safi M., Decuypere E. 1999. Insulin-like growth factors in the regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol*. 17: 299–313

[68] Paczoska-Eliasiewicz H. 1999. Udział histaminy w czynności jajnika kury domowej (*Gallus domesticus*). *Zesz. Nauk. AR w Krakowie*, ser. Rozprawy, 248: Kraków.

[69] Paczoska-Eliasiewicz H. E., Geltler A., Proszkowiec M., Proudman J., Hrabia A., Sechman A., Mika M., Jacek T., Cassy S., Raver N., Rząsa J. 2003. Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian function in hens (*Gallus domesticus*). *Reproduction* 126: 739–751.

[70] Paczoska-Eliasiewicz H.E., Proszkowiec-Węglarz M., Proudman J., Jacek T., Mika M., Sechman A., Rząsa J., Gertler A. 2006. Exogenous leptin advances puberty in domestic hen. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31: 211–226.

[71] Palmer S.S., Bahr J.M. 1992. Follicle stimulating hormone increases serum oestradiol-17β concentrations, number of growing follicles and yolk deposition in aging hens (*Gallus domesticus*) with decreased egg production. *Br. Poult. Sci*. 33: 403–414.

[72] Perry M.M. 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature* 331: 70–72.

[73] Petitte J.N. 2002. The avian germline and strategies for the production of transgenic chickens. *J. Poult. Sci.* 39: 205–228.

[74] Porter T.E., Hargis B.M., Silsby J.L., El Halawani M.E. 1989. Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* 125: 109–116.

[75] Proszkowiec M., Rząsa J. 2001. Variation in the ovarian and plasma progesterone and estradiol levels of the domestic hen during pause in laying. *Folia Biol.* 49: 285–289.

[76] Proudman J.A., Scanes C.G., Johannsen S.A., Berghman L.R., Camp M.J. 2006. Comparison of the ability of the three endogenous GnRHs to stimulate release of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in chickens. *Domest. Anim. Endocrinol*. 31: 141–153

[77] Raymond C.S., Kettlewell J.R., Hirsch B., Bardwell V.J., Zarkower D. 1999. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol*. 215: 208–220.

[78] Reddy P.R., Siegel P.B. 1976. Selection for body weight at eight weeks of age. 11. Ovulation and oviposition patterns. *Poult. Sci*. 55: 1518–1530.

[79] Reed KJ, Sinclair AH. 2003. FET-1: a novel W-linked, female specific gene upregulated in the embryonic chicken ovary. *Gene Exp. Patterns* 2: 83–86.

[80] Renema R.A., Robinson F.E. 2004. Defining normal: comparison of feed restriction and full feeding of female broiler breeders. *World's Poult. Sci. J*. 60: 508–522.

[81] Renema R.A., Robinson F.E., Melnychuk V.L., Hardin R.T., Bagley L.G., Emmerson D.A., Blackman J.R. 1995. The use of feed restriction for improving reproductive traits in male-line white turkey hens. 2. Ovary morphology and laying traits. *Poult. Sci.* 74: 102–120.

[82] Rząsa J., Mika M., Paczoska-Eliasiewicz H. 1997. Zawartość hormonów steroidowych w pęcherzykach jajnikowych kury podczas dojrzewania płciowego. *Zesz. Nauk. Przegl. Hod.*, "Aktualne problemy w rozrodzie ptaków". PTZ, Warszawa, 31: 101–104.

[83] Rząsa J., Paczoska-Eliasiewicz H. 2000. Changes of ovarian catecholamine concentration during follicular growth and maturation in the domestic hen. *Br. Poult. Sci*. 41: S68–S69.

[84] Sechman A. 2003. Jajnik – tkanka docelowa dla hormonów tarczycy u kury (*Gallus domesticus*). *Zeszyty Naukowe AR Kraków*, Rozprawy 292: 1–101.

[85] Sechman A. 2005. Molekularne mechanizmy determinacji płci u ptaków. *Med. Wet*. 61: 19–23.

[86] Sechman A., Łakota P., Wojtysiak D., Hrabia A, Mika M., Lisowski M., Czekalski P., Rząsa J., Kapkowska E., Bednarczyk M. 2006. Sex steroids level in blood plasma and ovarian follicles of the chimeric chicken. *J. Vet. Med.*A 53: 501–508.

[87] Sechman A., Paczoska-Eliasiewicz H., Rząsa J., Hrabia A. 2000. Simultaneous determination of plasma ovarian and thyroid hormones during sexual maturation of the hen (*Gallus domesticus*). *Folia Biol.* (Kraków) 48: 7–12.

[88] Sechman A., Rząsa J. 2003. Effect of triiodothyronine on LH-induced steroids secretion by chicken ovarian follicles in vitro. XXXIIIrd ESNA Annual Meeting, Viterbo, Italy, Abstracts: 28–29.

[89] Sharp P.J., Talbot R.T., Main G.M., Fraser H.M., Huskinsson N.S. 1990. The physiological roles of chicken LHRH-I and –II in the control of gonadotropin release in the domestic chicken. *J. Endocrinol*. 124: 291–299.

[90] Shimada K. 1998. Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *J. Exp. Zool*. 281: 450–458.

[91] Shimada K., Olson D.M., Etches R.J. 1984. Follicular and uterine prostaglandin levels in relation to uterine contraction and the first ovulation of a sequence in the hen. *Biol. Reprod.* 31: 76–82.

[92] Sirotkin A.V., Grossmann R., Maria-Peon M.T., Roa J., Tena-Sempere M., Klein S. 2006. Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. *Mol. Cell Endocrinol*. 257–258: 15–25.

[93] Skrzyszowska M., Karasiewicz J., Bednarczyk M., Samiec M., Smorąg Z., Was B., Guszkiewicz A., Korwin-Kossakowski M., Gorniewska M., Szablisty E., Modliński J.A., Lakota P., Wawrzyńska M., Sechman A., Wojtysiak D., Hrabia A., Mika M., Lisowski M., Czekalski P., Rząsa J., Kapkowska E. 2006. Generation of cloned and chimeric embryos/offspring using the new methods of animal biotechnology. *Reprod. Biol.* 6 Suppl 1: 119–135.

[94] Smith C.A., Clifford V., Western P.S., Wilcox S.A., Bell K.S., Sinclair A.H. 2000. Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo. *J. Mol. Endocrinol*. 24: 23–32.

[95] Smith C.A., Katz M., Sinclair A.H. 2003. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol. Reprod.* 68: 560–570.

[96] Smith C.A., Sinclair A.H. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays* 26: 120–132.

[97] Smith C.A., Smith M.J., Sinclair A.H. 1999. Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 187–196.

[98] Smith C.A., Smith M.J., Sinclair A.H. 1999. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234: 395–402.

[99] Tajima A. 2002. Production of germ-line chimeras and their application in the domestic chicken. *Avian Poult. Biol. Rev*. 13: 15–30.

[100] Tilly J.L., Johnson A.L. 1989. Regulation of androstendione production by adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol myristate acetate in ovarian thecal cells of the domestic fowl. *Endocrinology* 125: 1691–1699.

[101] Tilly J.L., Kowalski K.I., Johnson A.L. 1991. Stage of follicular development associated with the initiation of steroidogenic competence in avian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 44: 305–314.

[102] Tilly J.L., Kowalski K.I., Li Z., Levorse J.M., Johnson A.L. 1992. Plasminogen activator activity and thymidine incorporation in avian granulosa cells during follicular development and the periovulatory period. *Biol. Reprod*. 46: 195–200.

[103] Tischkau S.A., Neitzel L.R., Walsh J.A., Bahr J.M. 1997. Characterization of the growth center of the avian preovulatory follicle. *Biol. Reprod.* 56: 469–474.

[104] Tsutsui K., Saigoh E., Ukena K., Teranishi H., Fujisawa Y., Kikuchi M., Ischii S., Sharp P.J. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 275: 661–667.

[105] Williams J.B., Sharp P.J. 1977. A comparison of plasma progesterone and luteinizing hormone in growing hens from eight weeks of age to sexual maturity. *J. Endocrinol*. 75: 447–448.

[106] Wilson S.C., Sharp P.J. 1975. Effects of progesterone and synthetic luteinizing hormone-releasing hormone on the release of the luteinizing hormone during sexual maturation in the hen (*Gallus domesticus*). *J. Engocrinol*. 67: 359–369.

[107] Yao H.H.C, Bahr J.M. 2001. Germinal disc-derived epidermal growth factor: a paracrine factor to stimulate proliferation of granulosa cells. *Biol Reprod*. 64: 390–395.

[108] Yoshida K., Shimada K., Saito N. 1996. Expression of $P450_{17\alpha}$ hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 233–240.

[109] Zhu L., van de Lavoir M.C., Albanese J., Beenhouwer D.O., Cardarelli P.M., Cuison S., Deng D.F., Deshpande S., Diamond J.H., Green L., Halk E.L., Heyer B.S., Kay R.M., Kerchner A., Leighton P.A., Mather C..M., Morrison S.L., Nikolov Z.L., Passmore D.B., Pradas-Monne A., Preston B.T., Rangan V.S., Shi M., Srinivasan M., White S.G., Winters-Digiacinto P., Wong S., Zhou W., Etches R.J. 2005. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat. Biotechnol.* 23: 1159–1169.

Avian biology of reproduction – achievements and perspectives

Key words: bird, reproductive system, embryogenesis, in vitro fertilization, hypothalamus, pituitary, ovary, broiler breeders

Summary

Paper presents a review of knowledge concerning avian biology of reproduction. In comparison with mammals, there are several differences in avian reproduction: i) female is heterogametic (ZW) but male homogametic (ZZ); ii) the female reproductive tract is non-symmetrical (i.e. only left ovary and oviduct are developed); iii) in the male reproductive tract the additional reproductive glands are absent; iv) an oocyte is

felt with a huge amount of yolk; v) fertilization is followed by polyspermy; vi) ovulations occur day after day. The main trends in research concerning avian reproductive biology are connected with: 1) embryogenesis process as a model for studies of mechanisms of sex determination and sex differentiation, organogenesis etc.; 2) in vitro fertilization and transgenesis; 3) function of hypothalamo-pituitary-ovarian axis and processes involved in gonadal function during sexual maturation and egg laying period; 4) reproduction of broiler breeder hens, i.e. broiler breeder paradox. The main attainment in avian reproductive biology seem to be: a) achievements in selection of the ceiling egg-laying performance; b) elaboration of the in vitro fertilization (IVF) and ICSI; c) control of blastodermal (BC) and primordial germ cells (PGC) manipulation and conservation; d) utilization of the avian oviduct as a bioreactor for production of human therapeutical proteins; e) study of the endocrine regulations of the ovarian function in laying hens. The future challenge is to study role of growth and metabolic hormones in regulation of egg laying rate in broiler breeder hens where feed restriction is necessary to maintain welfare and reproduction at acceptable levels.

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 113–124

Rozród ryb – kierunki badań w Polsce i na świecie na początku XXI wieku

Krzysztof Bieniarz*, Jarosław Chyb, Paweł Szczerbik, Piotr Epler
Katedra Ichtiobiologii i Rybactwa, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, ul. Prof. Spiczakowa 6, 30-199 Kraków
e-mail: rzbienia@kinga.cyf-kr.edu.pl

Słowa kluczowe: neurohormonalna regulacja rozrodu, LH, FSH, GnRH, różnicowanie płciowe, czynniki środowiskowe, zanieczyszczenie wód, hormony steroidowe gonad, feromony, akwakultura

Początek XXI wieku jest okresem, który charakteryzuje się intensyfikacją działań na rzecz dokładniejszego poznania procesów odpowiedzialnych za dojrzewanie płciowe i rozród ryb. Wynika to w dużej mierze z coraz większej dostępności nowoczesnych technik biologii molekularnej, które pozwalają śledzić wiele procesów stojących u podstaw powstawania i funkcjonowania czynników hormonalnych uczestniczących w rozrodzie ryb. Z drugiej jednak strony nie ustają prace nad doskonaleniem metod rozrodu ryb w warunkach hodowlanych, co jest logiczną konsekwencją zdobywania coraz dokładniejszych danych w trakcie badań podstawowych. Niniejsza praca koncentruje się przede wszystkim na przedstawieniu najważniejszych doniesień, które zaprezentowano w trakcie dwóch ostatnich międzynarodowych sympozjów związanych z tematyką endokrynologii i rozrodu ryb – VII Międzynarodowego Sympozjum Fizjologii Rozrodu Ryb (Japonia, maj 2003) oraz V Międzynarodowego Sympozjum Endokrynologii Ryb (Hiszpania, czerwiec 2004).

Neurohormonalna regulacja rozrodu u ryb

Nie ustają badania nad dawno już odkrytymi neurohormonami stymulującymi przysadkę mózgową do wydzielania gonadotropin – GnRH. Uważa się obecnie, że u kręgowców istnieje aż 16 form GnRH tworzących rodzinę wielofunkcyjnych peptydów powstających w wielu miejscach centralnego systemu nerwowego, a nawet w tkankach peryferyjnych. Stwierdzono, że pełnią one różne funkcje: neuroendokrynną, neurotransmisyjną oraz autokrynną i parakrynną. Wszystkie gatunki kręgowców mają dwa, a część ryb z nadrzędu *Teleostei* nawet 3 podtypy GnRH [30]:

- GnRH 1 działa na gonadotropy przez receptory – GnRH-R typ I A,
- GnRH 2 stymuluje sekrecję prolaktyny przez receptory – GnRH-R typ I B,
- GnRH 3 stymuluje sekrecję hormonu wzrostu przez receptory GnRH-R typ III.

U ryb najczęściej występuje łososiowy GnRH – sGnRH i kurzy GnRH typu drugiego – cGnRH II, a np. flądra – *Verasoer moseri* oprócz wcześniej wymienionych ma jeszcze GnRH leszcza morskiego (seabream) – sbGnRH [1].

Ta różnorodność GnRH powoduje kłopoty z ich kwalifikacją z użyciem arabskich i łacińskich liczb. Okazało się, że musi się ona oprzeć na identyfikacji genów kodujących prekursory GnRH i ich receptory. Przykładem tych trudności mogą być badania mające rozstrzygnąć, czy I GnRH występujący u ssaków jest z tej samej rodziny, co I GnRH występujący u innych grup kręgowców. Dopiero badając receptory i ich geny (wyodrębniono dotychczas 5 genów kodujących receptory GnRH) stwierdzono, że receptor ssaczego GnRH typu I różni się zasadniczo od GnRH-RI nie ssaczego, a więc ssaczy GnRH-RI nie może być w tej samej rodzinie, co GnRH-RI zidentyfikowany u innych kręgowców [12].

Okres smoltyfikacji jest przełomowym w życiu migrujących ryb łososiowatych. Badania nad *Oncorhynchus nerka* i *Oncorhynchus keta* wykazały, że mają one 2 rodzaje GnRH: łososiowy – sGnRH i kurzy II – cGnRHII, które w procesie smoltyfikacji i wędrówki tarłowej zachowują się inaczej. Poziom sGnRH w różnych częściach mózgu był synchronizowany z poziomem hormonów tarczycy w surowicy krwi i poziomem gonadotropin w przysadce. Natomiast cGnRHII takiej synchronizacji nie wykazywał. Oznacza to, że sGnRH i cGnRHII odgrywają różne role w procesie smoltyfikacji.

Hormony gonadotropowe

Udowodnienie w końcu lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia, istnienia dwóch gonadotropin u ryb doprowadziło do zintensyfikowania badań nad występowaniem i rolą tych hormonów u kostnoszkieletowych. Do najciekawszych wyników ostatnich lat niewątpliwie należy wykrycie ekspresji genów kodujących podjednostki gonadotropin w oocytach ryb. Użycie techniki hybrydyzacji in situ oraz immunocytochemii pozwoliło na stwierdzenie obecności podjednostek FSHβ, LHβ oraz wspólnej dla obydwu gonadotropin podjednostki α w oocytach *Sparus aurata* [42, 43]. Co więcej, w doświadczeniach in vitro (inkubacja fragmentów jajnika) analog GnRH modulował sekrecję jajnikowego LH. Dane te świadczą o istnieniu osi GnRH – gonadotropiny w jajniku i sugerują, że FSH i LH pełnią istotną, nieznaną wcześniej funkcję w komunikacji pomiędzy oocytem i komórkami folikularnymi.

Innym kierunkiem badań jest poznawanie innych, poza GnRH, czynników uwalniających gonadotropiny z przysadki mózgowej ryb. Stwierdzono, że łososiowy GnRH (sGnRH) stymuluje u niektórych łososiowatych syntezę i uwalnianie LH

dopiero w późniejszych stadiach dojrzałości płciowej, a steroidy płciowe (E_2 i T) we wcześniejszych stadiach dojrzałości [3].

Ciekawa jest rola aktywiny, białka zidentyfikowanego początkowo w gonadach ssaków. U złotej rybki aktywina stymuluje syntezę podjednostki FSHβ, ale hamuje syntezę podjednostki LHβ. Ta regulacyjna rola aktywiny zachodzi na poziomie transkrypcji [1]. Inne badania z tego zakresu wykazały, że aktywina moduluje spontaniczną oraz stymulowana przez GnRH sekrecję LH zarówno u samców, jak i u samic karpia [7].

Na uwagę zasługują także badania nad greliną. Hormon ten został odkryty przez Kojima i in. [15] jako endogenny ligand receptora GHS-R (growth hormone-secretagogue receptor). Unniapan i Peter [41] obserwowali stymulację sekrecji LH z izolowanych (dyspergowanych) komórek przysadki mózgowej karasia złocistego. Grelina powodowała także zwiększenie ekspresji mRNA LH, zatem wydaje się, że u karasia złocistego hormon ten jest jednym z czynników stymulujących zarówno syntezę jak i uwalnianie LH. Za pośrednictwem GHS-R grelina stymuluje sekrecję hormonu wzrostu, natomiast stymulacja sekrecji LH prawdopodobnie odbywa się za pośrednictwem receptora zbliżonego do GHS-R, jako że zastosowanie antagonistów tego receptora hamuje stymulowaną przez grelinę sekrecję LH [41].

Kolejnym czynnikiem hamującym sekrecję LH jest dopamina [6]. Trwają badania nad poznaniem receptorów, poprzez które dopamina hamuje sekrecję LH.

Odkrycie, że u ryb występują 2 gonadotropiny (GtH I odpowiadająca FSH i GtH II będąca odpowiednikiem LH u ssaków), podobnie jak i w pozostałych gromadach kręgowców, zapoczątkowało szereg badań nad ich rolą u samic i samców, nad ich receptorami i genami je kodującymi. Obecnie przyjmuje się, że u samic, jakkolwiek w gametogenezie biorą udział obie gonadotropiny, to jednak LH odgrywa podstawową rolę w tym procesie m.in. stymuluje produkcję 17α20β-P i 17β-estradiolu, a FSH bierze przede wszystkim udział w dostawaniu się witellogeniny do oocytów, mimo że również stymuluje w warunkach in vitro produkcję 17β-estradiolu. U samców LH stymuluje produkcję 11-KT i 17α20β–P, FSH zaś stymuluje proliferację spermatogonii [36]. Jednak funkcje LH i FSH nie są identyczne u poszczególnych gatunków ryb. Pociąga to za sobą konieczność zbadania działań tych gonadotropin oddzielnie u każdego gatunku. Szereg badań nad rozrodem ryb zmierza w tym kierunku.

Fizjologiczną rolę LH i FSH bada się też na poziomie molekularnym, poprzez analizowanie ekspresji genów kodujących podjednostki gonadotropin w trakcie rozwoju gonad [10]. Wykazano m.in., że insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF) ma wpływ na ekspresję genów kodujących podjednostki gonadotropin u łososia atlantyckiego *Salmo salar* [32].

Różnicowanie płciowe

U *Teleostei* występuje stosunkowa duża grupa ryb hermafrodytycznych. W tej grupie ryb wyróżnia się trzy rodzaje hermafrodytyzmu: hermafrodytyzm synchroniczny (u jednego osobnika równocześnie występują dojrzałe jajniki i jądra), hermafrodytyzm protogynalny (u tego samego osobnika najpierw rozwijają się jajniki, a po ich atrofii rozwijają się jądra) oraz hermafrodytyzm protoandralny (u tego samego osobnika najpierw rozwijają się jądra, a po ich atrofii jajniki).

Ryby te są ciekawym przedmiotem badań w wielu laboratoriach zwłaszcza w odniesieniu do procesu różnicowania się płci. Proces ten to kaskada zdarzeń prowadząca do sformowania funkcjonalnych jąder lub jajników. U *Teleostei* steroidy są fizjologicznymi stopniami w tej kaskadzie, a dodatkowo u samic bardzo ważną rolę odgrywa również aromataza. Jest ona podstawowym enzymem biorącym udział w różnicowaniu jajnika u wszystkich ryb, które do tej pory zbadano [26]. Warto nadmienić, że inhibitora aromatazy używa się często do maskulinizacji łososia atlantyckiego [16].

Wiadomo, że estrogeny aktywują różnicowanie jajników, a hamują różnicowanie jąder, jednak nie jest do końca jasne, jaki jest tego mechanizm. Ciekawe jest, że u samic węgorzy *Anguilla japonica* i *Anguilla dieffenbachii* 11-KT odgrywa ważną rolę. Jest on pochodzenia jajnikowego i jest jednym z czynników kontrolujących protoplazmatyczny wzrost oocytów, zwiększa produkcję witellogeniny w wątrobie, gdzie jej powstawanie jest indukowane przez estradiol [19]. Również udział androgenów w procesie różnicowania się jąder jest bardzo kontrowersyjny.

U ryb w trakcie różnicowania się gonad występuje znacznie więcej zróżnicowanych strategii i hormonalnych regulacji niż u ssaków. Powoduje to, że rezultaty otrzymane dla poszczególnych gatunków trudne są do porównania. Równocześnie jednak stymuluje do dalszych badań nad procesem różnicowania się gonad u coraz to nowych gatunków, a w tym gatunków hermafrodytycznych.

Badania różnicowania się gonad w XXI wieku nie mogą się obyć bez zejścia na poziom molekularny. Odkryto m.in., że grupa genów określana jako C_1 i biorąca udział w różnicowaniu się gonad, zawiera geny odpowiedzialne za szlaki steroidogenezy. Chodzi tu o kilka steroidowych enzymów (11H, 11βH, 3βHSD) oraz o czynniki transkrypcyjne włączone w regulowanie transkrypcji steroidowych enzymów i białek biorących udział w transporcie cholesterolu w mitochondriach [5].

U ssaków gen *Sry* jest genem określającym płeć. Podobny do niego gen – *DMY* odkryto po raz pierwszy u *Oryzias curvinotus* i u *Oryzias latipes*. Związany jest on z chromosomem Y i jest niezbędny do rozwoju jąder [19, 25]. Ciekawe, że u tych ryb stwierdzono transkrypty genu *DMY* nie tylko w jądrach, ale i w mózgu, wątrobie, oczach i mięśniach [27]. U *Dicentrarchus labrax* natomiast stwierdzono ekspresję genu estrogenowego receptora typu α (ER α) głównie w przysadce mózgowej i gonadach, natomiast ekspresję genu estrogenowego typu β (ER β) stwierdzono nie tylko

w przysadce i gonadach, ale również we wszystkich innych tkankach [31]. *DMY* jest homologiem genu *DMRT1*, biorącego udział w dojrzewaniu płciowym samców u różnych kręgowców. Prawdopodobnie u *Oryzias latipes DMRT1* jest jednym z regulatorów spermatogenezy, natomiast u tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*) pełni istotną rolę w różnicowaniu jąder [25].

Steroidy, aby mogły wywrzeć swoje działanie, musza się dostać z miejsca, gdzie powstały do organu docelowego. Dlatego tak ważne dla pełnego zrozumienia hormonalnej kontroli dojrzewania płciowego i rozrodu u ryb są badania nad białkami transportującymi hormony steroidowe. Takimi białkami są pewne globuliny znajdujące się w plazmie krwi (SHBG – sex hormone binding globulin). Niedawno wyizolowano i scharakteryzowano cDNA kodujący tego typu substancje u karpia [24].

Czynniki środowiskowe w rozrodzie ryb

Mimo niewątpliwego udziału czynników genetycznych w różnicowaniu się płci, u niektórych ryb stwierdzono bardzo wyraźny wpływ na ten proces czynników zewnętrznych, a zwłaszcza temperatury. U *Odontesthes bonariensis* stwierdzono ponad wszelką wątpliwość, że temperatura ma decydujący wpływ na różnicowanie się płci. Ryby chowane od wylęgu do końca stadium juwenilnego w temperaturze 19°C lub niższej okazały się w 100% samicami. Natomiast w populacji ryb chowanych w temperaturze 29°C występowania samic w ogóle nie stwierdzono. Sugeruje to, że różnicowanie gonad zachodzi bardzo wcześnie, bo między pierwszym a piątym tygodniem od momentu wylęgu, przy długości ciała od kilku do kilkunastu mm [35].

U innych gatunków np. u *Pagrus major* płeć jest określana na równi przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe [13]. Inne ciekawsze wyniki badań nad wpływem czynników zewnętrznych na rozród ryb, to:

- stwierdzenie, że stałe oświetlenie hamuje rozród samic i samców okonia oraz że sezonowe zmiany długości dnia świetlnego są konieczne do prawidłowego rozrodu tej ryby [20].
- wykazanie, że fotoperiod i temperatura modulują sezonową ekspresję genów receptorów *FSH* (*FSHR*) i *LH* (*LHR*) u łososia atlantyckiego [2].

Zanieczyszczenia wód

Zanieczyszczenie wód powierzchniowych jest wciąż istotnym problemem, zwłaszcza, że wpływ szeregu substancji, uwalnianych do wód wskutek działalności człowieka, na organizmy wodne nie został jeszcze w pełni poznany. W dalszym ciągu rozwijane są badania nad związkami, których wpływ jest stosunkowo dobrze znany, jak chociażby sole metali ciężkich [37]. Z drugiej strony w polu zainteresowań

badaczy pojawiają się między innymi ftalany (estry kwasu ftalowego), furany, dioksyny i polichlorowane bifenyle.

Szereg związków chemicznych może wywierać wpływ na syntezę i metabolizm hormonów steroidowych gonad u ryb. Interesujących danych na ten temat dostarczyły między innymi doświadczenia przeprowadzone przez Thibault i Porte [39]. Autorzy ci badali działanie związków wykazujących aktywność estrogenową, bądź androgenową (nonylfenol, dikofol, fenarimol, ftalany) na metabolizm androstendionu w jądrach (aktywność dehydrogenazy 17β-hydroksysteroidowej i 5α-reduktazy) oraz syntezę MIH (hormonu indukującego dojrzewanie) w jajnikach (aktywność dehydrogenazy 20α i 20β-hydroksysteroidowej). Badania in vitro wykazały wyższą wrażliwość 5α-reduktazy na badane substancje w porównaniu z dehydrogenazą 17β-hydroksysteroidową, a do substancji najsilniej hamujących aktywność tego enzymu należały ftalany. Natomiast na aktywność dehydrogenaz 20α- i 20β-hydroksysteroidowej największy wpływ wywierały nonylfenol i dikofol. Lerner i McCormick [17] wykazali (w doświadczeniach na łososiu atlantyckim *Salmo salar*), że ekspozycja na działanie nonylfenolu w stadium larwalnym może mieć bardzo istotny i długoterminowy wpływ na rozwój młodych ryb (smoltów). Larwy łososia (z woreczkiem żółtkowym) były poddawane trwającej trzy tygodnie ekspozycji na nonylfenol w koncentracjach spotykanych w wodach (10, lub 100 $\mu g \cdot L^{-1}$) oraz 17β-estradiol w koncentracji 2 $\mu g \cdot L^{-1}$. Po zakończeniu ekspozycji ryby były utrzymywane przez rok, kiedy to możliwe było dokonanie oceny wpływu badanych substancji na zaburzenia rozwoju smoltów. Ekspozycja na nonylfenol w najwyższym stężeniu zwiększyła śmiertelność larw (50% śmiertelności, podczas gdy w pozostałych grupach nie przekraczała 5%). Natomiast u larw eksponowanych na 10 $\mu g \cdot L^{-1}$ nonylfenolu lub 17β-estradiol obserwowano opóźniony efekt (w czasie dwóch miesięcy po zakończeniu ekspozycji śmiertelność w tych grupach była kilkakrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej). Ryby z tych dwu grup wykazywały (jako larwy) obniżoną aktywność Na^+K^+-ATPazy w skrzelach i obniżoną tolerancję na zwiększone zasolenie wody (jako smolty – rok po ekspozycji). U ryb tych obserwowano ponadto o wiele silniejszą reakcję stresową na skutek stresu manipulacyjnego, co przejawiało się między innymi w gwałtowniejszym wzroście poziomu kortyzolu we krwi w porównaniu z rybami, których nie poddawano działaniu nonylfenolu ani 17β-estradiolu w okresie larwalnym.

Fizjologia gonad u samców

W początkowym okresie badań na rozrodem ryb koncentrowano się głównie nad samicami, gdyż przy sztucznym tarle u znacznej liczby gatunków chowanych w stawach, właśnie one stwarzały największe trudności. Od pewnego czasu coraz więcej uwagi poświęca się dojrzewaniu płciowemu i rozrodowi samców. Ustalono m.in., że odnawianie się spermatogonii jest regulowane przez 17β-estradiol, a proliferacja spermatogonii jest stymulowana przez 11-KT, mimo że jak wykazano dotychczas

hormon ten działa za pośrednictwem substancji hamującej spermatogenezę oraz poprzez aktywinę A. Działanie E_2 i 11-KT odbywa się również za pośrednictwem czynników produkowanych w komórkach Sertoliego. Niezależnie od tego, sam E_2 działa za pośrednictwem pewnego czynnika o nazwie spermatogonial stem-cell renewal factor [22]. Jak widać mechanizm kontrolujący działanie 11-KT jest niejasny i dlatego wymaga dalszych badań. Nie budzi natomiast wątpliwości fakt, że dojrzewanie plemników jest regulowane przez 17α, 20β-P [22].

U większości gatunków ryb, u których zaplemnienie jaj następuje w wodzie, plemniki uzyskują ruchliwość po zetknięciu się z wodą. Jednak u niektórych gatunków, np. u śledzi, plemniki po zetknięciu się z wodą są mało ruchliwe, a większą ruchliwość uzyskują, gdy znajdą się w pobliżu owulowanych jaj. Wykryto i opisano białko aktywujące poruszanie się plemników. Znajduje się ono w zowulowanych jajach kilku gatunków śledzi. W dalszych badaniach udało się z biblioteki jajnikowego cDNA wyizolować klon sekwencję DNA kodującą białka aktywujące ruchliwość plemników u śledzi i w rezultacie ustalić sekwencję aminokwasów wchodzących w skład tego białka. Okazało się, że przypominają one inhibitory akrosyny u ssaków. Białka te są syntetyzowane w komórkach folikularnych, a następnie akumulowane w otoczce jajowej w czasie rozwoju oocytów, po czym są uwalniane do wody w czasie tarła [28].

Hormony steroidowe

Interesujące i perspektywiczne są badania nad receptorami hormonów steroidowych. Okazało się, że steroidy działają nie tylko przez receptory jądrowe, ale również przez receptory błonowe (membrane receptors) znajdujące się na powierzchni komórki. Przykładem tego może być działanie progestynu indukującego dojrzewanie oocytów u ryb i płazów poprzez aktywację membranowych receptorów progestynu (mPR) na oocytach [40]. U ryb stwierdzono także występowanie membranowych receptorów estrogenowych (mER) i androgenowych (mAR). Dotychczas odkryto na przykład 28 androgenowych receptorów w 19 różnych gatunków *Teleostei* i przeprowadzono ich sekwencjonowanie, co pozwoliło zakwalifikować je do 2 rodzin [8]. Wydaje się, że badania prowadzone w tym kierunku są obiecujące i interesujące również z punktu widzenia praktycznego.

Feromony

Feromony odgrywają dużą rolę w życiu ryb. Poznanie feromonów ryb może mieć duże znaczenie w hodowli i chowie ryb. Badania nad feromonami idą w parze z badaniami czynników stymulujących zachowania rozrodcze. Udowodniono, że samce *Neogobius melanostomus*, „przywleczone" z Morza Czarnego do Wielkich jezior Ameryki Północnej wydzielają feromony płciowe [44]. Wiąże się z tym

odkryciem nadzieje na opracowanie metody na ograniczenie populacji tych ryb zachwaszczających Wielkie Jeziora.

Inne ciekawe wyniki badań z tego zakresu to stwierdzenie, że:

- kwasy aminowe są tymi substancjami które *Oncorhynchus keta* wyczuwa w wodzie słodkiej po powrocie z morza i kieruje się nimi w wędrówce w górę rzeki [33];
- minogi morskie wędrują na tarliska w górę rzek kierując się feromonami uwalnianymi do wody przez jego larwy [34];
- kortyzol i testosteron odgrywają ważną rolę w regulowaniu wędrówek rozrodczych jesiotra rosyjskiego *Acipenser gueldenstadtii* [4];
- feromony uwalniane do wody przez dojrzałe płciowo węgorze europejskie *Anguilla anguilla* stymulują dojrzewanie płciowe u innych osobników tego gatunku [11].

Akwakultura

W chowie i hodowli ryb dużą rolę odgrywa sztuczny rozród, przy użyciu najczęściej rybich gonadotropin, szeregu analogów GnRH oraz środków antydopaminergicznych. Używanie czystych gonadotropin rybich jest bardzo ograniczone, ze względu na bardzo wysoki koszt, związany z pozyskiwaniem przysadek mózgowych i samym procesem oczyszczania gonadotropin. Na razie bowiem nie uzyskuje się ich w wyniku syntezy. Dlatego duże nadzieje wiąże się z produkcją rekombinowanych gonadotropin w innych (niż przysadka mózgowa) tkankach lub w innych tkankach innych niż ryby zwierząt. I tak udało się już otrzymać rekombinowane FSH i LH karasia produkowany przez bakulowirusa wprowadzonego do larw jedwabnika. Hemolimfa tych larw zawierała rekombinowane FSH (rFSH) i LH (rLH). Iniekcje takiej hemolimfy zawierającej rFSH lub rLH samcom karasia złotej rybki powodowało produkcję nasienia, natomiast iniekcja hemolimfy zawierającej rLH samicom *Rhodeus ocellatus ocellatus* wywoływała owulację [14]. Sukcesem zakończyły się również próby syntezy rekombinowanych aktywnych gonadotropin karasia w jajach transgenicznych pstrągów tęczowych [23]. Prowadzone były również prace nad zastąpieniem środków antydopaminergicznych, stosowanych aktualnie do prowokowania tarła u ryb wespół z analogami GnRH, przez inhibitory aromatazy [21].

W 2003 roku ukazało się doniesienie o pierwszym na świecie uzyskaniu w warunkach sztucznych narybku szklistego węgorza japońskiego [38]. Samice węgorza trzymane w wodzie morskiej otrzymywały raz w tygodniu iniekcje ekstraktu przysadek łososiowych (20 mg na 1 rybę). Wywołało to witellogenezę i spowodowało przejście oocytów do stadium migracji jądra. Następnie podano samicom 17,20β-P w postaci iniekcji w dawce 2 $\mu g \cdot g^{-1}$ masy ciała, w wyniku czego owulacja nastąpiła w 15 do 18 godzin po ostatniej iniekcji. Zapłodnione jaja trzymano w wodzie o temperaturze 22–23°C. Larwy wylęgły się po około 40 godzinach. Miały one 3,7 mm długości i zawierały kroplę tłuszczu i żółtko. Pokarm zaczęły pobierać po

7 dniach. W tym czasie obserwowano pojawienie się pigmentu w oczach i enzymów trawiennych. Wylęgnięte larwy były karmione hydrolizowanym krylem z dodatkiem mączki sojowej, witamin i soli mineralnych. Metamorfoza w szklisty narybek nastąpiła po 250 dniach od wylęgu. Z kolei dojrzałe samce otrzymano w wyniku iniekowania ich ludzką gonadotropiną łożyskową w ilości 1 IU · g^{-1} masy ciała. Iniekcje robiono raz w tygodniu i po 9 do 11 tygodniach uzyskano samce dające funkcjonalne nasienie. Ponieważ ruchliwość plemników bardzo szybko się obniżała, zastosowano specjalny rozcieńczalnik (ASP artificial seminal plasma) o następującym składzie 149,3 mM NaCl, 15,2 mM KCl, 1,3 mM $CaCl_2$, 1,6 mM MgCl, 20 mM $NaHCO_3$. Był on zbuforowany do pH 8,1 przy pomocy 20 Mm TAPS-NaOH.

W ślad za opracowaniem metody rozrodu węgorza japońskiego w warunkach sztucznych pojawiły się też doniesienia o zastosowaniu tej metody w odniesieniu do węgorza europejskiego [29]. W tym wypadku jednak samice wykazywały opóźnioną i zróżnicowaną osobniczo odpowiedź na hormonalną stymulację dojrzewania płciowego.

Otrzymane wyniki dają nadzieję na opracowanie w pełni doskonałej metody otrzymywania narybku szklistego węgorzy w warunkach sztucznych. Otrzymanie przez autorów cytowanej pracy narybku szklistego węgorza japońskiego nie jest jeszcze wynikiem zastosowania w pełni zadawalającej metody. Świadczy o tym m.in. duża śmiertelność larw i 2-krotnie dłuższy okres larwalny (od wylęgu do metamorfozy w narybek szklisty) niż obserwowany w naturze. Teraz już jednak nie ma wątpliwości, że opracowanie metody, umożliwiającej w praktyce rybackiej chów węgorza w pełnym cyklu reprodukcyjnym jest tylko kwestią czasu. Dzięki temu będzie można zapobiec wyginięciu tych cennych gatunków ryb.

Przedstawione powyżej najważniejsze badania związane z rozrodem ryb, które prowadzone są na całym świecie, z pewnością nie dają pełnego i wyczerpującego obrazu działań, które podejmowane są w celu dokładniejszego poznania wszelkich aspektów dojrzewania płciowego i rozrodu tych zwierząt. Wydaje się jednak, że trafnie wskazują one kierunki badawcze, które dominować będą w najbliższych latach zarówno w badaniach podstawowych jak i stosowanych.

Literatura

[1] Amano M., Okubo K., Yamanome T., Oka Y., Kitamura S., Ikuta K., Takahashi A., Aida K., Yamamori K. 2003. GnRH systems in masu salmon and barfin flounder. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 19–22.

[2] Andersson E., Kumar S.R., Ackers J., Taranger G.L., Stefansson S.O., Trant J.M. 2003. Photoperiod and temperature affects seasonal ovarian gene expression of P450 aromatase and gonadotropin receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) broodstock. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 411.

[3] Ando H., Swanson P., Urano A. 2003. Regulation of LH Fish synthesis and release GnRH and gonadal steroids in masu salmon. *Physiol. Biochem.* 28: 61–63.

[4] Barannikova I.A., Baunova L.V., Gruslova A.B., Semenkova T.B. 2003. Steroids in sturgeon's migration regulation. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 263–264.

[5] Baron D., Guiguen Y. 2003. Gene expression during gonadal sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from candidate genes studies to high throughout genomic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 119–123.

[6] Berta L.-S., Ayelet A., Tamir K. 2003. Characterization of the inhibitory dopamine receptor from the pituitary of tilapia. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 73–75.

[7] Chyb J., Sokolowska-Mikolajczyk M., Mikolajczyk T., Socha M., Epler P. 2003. Differential impact of recombinant human activin on LH secretion in male and female common carp during wintering and spawning period. *Fish Physiol. Biochem*. 28: 91–92.

[8] Douard V., Robinson-Rechavi M., Laudet V., Guiguen Y. 2003. Molecular evolution of androgen receptors in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 207–208.

[9] Ge W., Ko N.-L., Pang F.Y.-M., Chung M.-F., Lin S.-W., Yuen C.-W., Lau M.-T., Liu L., Sohn Y., C., Kobayashi M., Aida K. 2003. Activin stimulates goldfish FSH biosynthesis by enhancing FSHβ promoter activity. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 65–71.

[10] Gen K., Yamaguchi S., Okuzawa K., Kumakura N., Tanaka H., Kagawa H. 2003. Physiological roles of FSH and LH in red seabream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 77–80.

[11] Huertas M., Scott A., P., Cerda J. 2004. Evidence for the existence of a male-secreted pheromone that stimulates gonad maturation in the european eel. Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[12] Ikemoto Y., Oka Y., Park M.K. 2003. Existence of multiple isoforms of GnRH ligands and receptors in the dwarf gourami *Colisa lalia*. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 41–42.

[13] Kato K., Miyashita S., Murata O., Kumai H. 2003. Gonadal sex differentiation and sex control in red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 155–156.

[14] Kobayashi M., Morita T., Ikeguchi K., Yoshizaki G., Suzuki T., Watabe S. 2003. Production of recombinant goldfish gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 469–471.

[15] Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656–660.

[16] Lee P.S., King H.R., Pankhurst N.W. 2003. A comparison of aromatase inhibitors for the sex reversal of female Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) *Fish Physiol. Biochem.* 28: 159–160.

[17] Lerner D.T., McCormick S.D. 2004. Effects of nonylphenol and 17β-estradiol on larval survival and smolt development of atlantic salmon, *Salmo salar*. Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[18] Matsubara M., Lokman P.M., Senaha A., Kazeto Y., Ijiri S., Kambegawa A., Hirai T., Young G., Todo T., Adachi S., Yamuchi K. 2003. Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis is eel (*Anguilla* spp.). *Fish Physiol. Biochem.* 28: 353–354.

[19] Matsuda M., Nagahama Y., Kobayashi T., Matsuda C., Hamaguchi S., Sakaizumi M. 2003. The sex determining gene of medaka: a Y-specific DM domain gene (DMY) is required for male development. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 135–139.

[20] Migaud H., Mandiki R., Gardeur J.N., Kestemont P., Bromage N., Fontaine P., 2003. Influence of photoperiod regimes on the Eurasian perch gonadogenesis and spawning. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 395–397.

[21] Mikolajczyk T., Chyb J., Sokolowska-Mikolajczyk M., Szczerbik P., Socha M., Epler P. 2004. Potentiation of the action of sGnRHA on LH secretion in goldfish by aromatase inhibitor – Fadrozole. Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[22] Miura T., Miura Ch.I. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 181–186.

[23] Morita T., Yoshizaki G., Kobayashi M., Takeuchi T. 2003. Production of biologically-active recombinant goldfish gonadotropins in transgenic rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 473 –474.

[24] Nagae M., Okunaga M., Hidaka R., Ohkubo N., Matsubara T. 2003. Molecular cloning of sex hormone-binding globulin cDNA in carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 215–216.

[25] Nagahama Y. 2004. Sex determination and gonadal sex differentation in fish. Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[26] Nakamura M., Bhandari R.K., Higa M. 2003. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 113–117.

[27] Ohmuro-Matsuyama Y., Matsuda M., Kobayashi T., Ikeuchi T., Nagahama Y., 2003. Expression of DMY and DMRT1 in the various tissues of the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Physiol. Biochem*. 28: 171.

[28] Ohtake H. 2003. Sperm-activating proteins obtained from the herring eggs. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 199–202.

[29] Palstra A.P., Cohen E., Niemantsverdriet P., van Ginneken V., van den Thillart G. 2004. Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[30] Parhar I.S. 2003. Gonadotropin-releasing hormone receptors: neuroendocrine regulators and neuromodulators. *Fish Physiol. Biochem*. 28: 13–18.

[31] Rodriguez L., Halm S., Mylonas C., Zanuy S. 2003. Gen expression of estrogen receptors α and β during early sexual differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. Biochem.* 28: 175.

[32] Schmitz M. 2003. Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin subunits expression in Atlantic salmon. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 105–106.

[33] Shoji T., Yamamoto Y., Nishikawa D., Kurihara K., Ueda H. 2003. Amino acids in stream water are essential for salmon homing migration. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 249–251.

[34] Sorensen P.W., Vrieze L.A., Fine J.M. 2004. A multi-component migratory pheromone in the sea lamprey. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 253–257.

[35] Strüssmann C.A., Oikawa T., Otake T., Kasuga S. 2003. Potential use of otolith microchemistry for field studies of temperature-dependent sex determination and gonadal degeneration in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 129–130.

[36] Swanson P., Dickey J.T., Campbell B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 53–59.

[37] Szczerbik P., Mikolajczyk T., Sokolowska-Mikolajczyk M., Socha M., Chyb J., Epler P. 2003. Influence of long term exposition on dietary cadmium on growth, maturatuion and reproduction of Prussian carp (*Carassius auratus gibelio* BLOCH). Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[38] Tanaka H., Kagawa H., Ohta H., Unuma T., Nomura K., 2003. The first production of glass eel in captivity: Fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 493–497.

[39] Thibault R., Porte C. 2004. Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[40] Thomas P. 2003 Rapid, nongenomic steroid actions initiated at the cell surface: lessons from studies with fish, *Fish Physiol. Biochem.* 28: 3–12.

[41] Unniapan S., Peter R.E. 2004. Ghrelin: a novel hypophysiotropic hormone in goldfish. Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[42] Wong T., Zohar Y. 2004. Novel expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in oocytes of a vertebrate model, the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Proc. 5th Int Symp Fish Endocrinol., September 5–9, Castellon, Spain.

[43] Wong T., Zohar Y. 2004. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Endocrinology* 145(11): 5210–5220.

[44] Zielinski B., Arbuckle W., Belanger A., Corkum L.D., Li W., Scott A.P. 2003. Evidence for the release of sex pheromones by male round gobies (*Neogobius melanostomus*). *Fish Physiol. Biochem.* 28: 237–239.

Fish reproduction – research trends in Poland and in the world at the beginning of XXI century

Key words: endocrine control of reproduction, LH, FSH, GnRH, sex differentiation, environmental factors, sex steroids, pheromones, aquaculture

Summary

An intensification of the studies on fish reproduction-related aspects withis observed in recent years. Actual trends in the research on fish reproduction are well illustrated by the latest international symposia on fish endocrinology and reproduction (VII International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, held in Japan in 2003 and V International Symposium on Fish Endocrinology in 2004 in Spain). The objects of great part of research papers presented on the above symposia were

investigations of the mechanisms of different reproductive hormones and neurohormones' effects. However, the research works concerning the possibilities of fish reproduction improvement under artificial conditions are being continued. Also the influence of undesirable changes in natural environment on selected fish reproduction-related aspects is still considered.

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 125–133

Osiągnięcia w zakresie badań podstawowych i aplikacyjnych biologii nasienia ryb

Jan Glogowski, Andrzej Ciereszko
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn
e-mail: glogo@pan.olsztyn.pl

Słowa kluczowe: ryby, rozród, plemniki, plazma nasienia, androgeneza, odwracanie płci, kriokonserwacja

W ostatniej dekadzie kontynuowano intensywne prace dotyczące andrologii ryb. Badania te miały zarówno charakter podstawowy jak i aplikacyjny. Zdaniem autorów, największy postęp osiągnięto w następujących obszarach: skład i rola plazmy nasienia, współzawodnictwo plemników, wpływ stresu na jakość nasienia, nowe techniki badania jakości nasienia, charakterystyka i konserwacja nasienia manipulowanych genetycznie i hormonalnie ryb oraz kriokonserwacja nasienia.

Skład i rola plazmy nasienia

Plazma nasienia ryb charakteryzujących się zapłodnieniem zewnętrznym pełni funkcję ochronną w odniesieniu do plemników w zakresie zdolności zapładniającej, zdolności do ruchu, przeżywalności (metabolizm i integralność membran komórkowych) oraz ochrony materiału genetycznego. W ostatnich latach istotnie poszerzono wiedzę na temat składu plazmy oraz mechanizmów odpowiedzialnych za ochronę nasienia.

W zakresie ochrony plemników przed uszkodzeniami oksydacyjnymi zidentyfikowano zarówno nisko- jak i wysokocząsteczkowe składniki plazmy. Wśród niskocząsteczkowych składników dominują: kwas askorbinowy (witamina C), tokoferol (witamina E) i kwas moczowy [7, 8]. Poziom wymienionych witamin i interakcje pomiędzy nimi mogą być regulowane poprzez żywienie [40]. Właściwości antyoksydacyjne mają także białka plazmy nasienia ryb. Należy do nich transferyna, która jest jednym z głównych białek w plazmie nasienia karpia [56]. Antyoksydacyjne właściwości transferyny wynikają z jej zdolności do wiązania wolnych jonów żelaza, które są katalizatorami reakcji tworzenia reaktywnych form tlenu.

Zastosowanie elektroforezy połączonej z detekcją aktywności żelatynolitycznej doprowadziło do identyfikacji szeregu enzymów proteolitycznych należących do proteinaz serynowych lub metaloproteinaz [30, 31]. Aktywność proteinaz serynowych kontrolowana jest przez trzy grupy inhibitorów [10, 11, 55]. Należą do nich serpiny (serine proteinase inhibitors) typu α-1-antyproteinazy [41] stanowiące jedne z głównych białek plazmy nasienia ryb. Ich funkcja może być związana z ochroną plemników przed proteinazami leukocytów oraz drobnoustrojów obecnych w nasieniu ryb [12]. Należy zaznaczyć, że także transferyna może mieć właściwości antybakteryjne, związane z usuwaniem żelaza niezbędnego do wzrostu bakterii.

Białka plazmy nasienia mogą uczestniczyć w immobilizacji plemników oraz utrzymaniu ich żywotności. Glikoproteinę o masie cząsteczkowej 120 kDa (SPP 120) wykryto w plazmie nasienia tilapii [42]. W plazmie nasienia SPP 120 występuje w postaci wysokocząsteczkowego polimeru o masie cząsteczkowej $\geq 10^6$ kDa. W takiej postaci SPP 120 wiąże się do plemników, powodując ich immobilizację. W utrzymaniu żywotności plemników pstrąga tęczowego, szczególnie w warunkach krótkookresowego przechowywania, dużą rolę przypisuje się białkom o masach cząsteczkowych 16, 47 i 54 kDa [37].

Plazma nasienia ryb ma potencjalne możliwości neutralizacji substancji toksycznych. W badaniach elektroforetycznych wykazano obecność niespecyficznych esteraz w plazmie nasienia ryb [54]. Wyniki badań z użyciem inhibitorów wskazują na przynależność omawianych enzymów do karboksyloesteraz, których funkcja związana jest z detoksykacją ksenobiotyków, np. pestycydów lub leków.

Współzawodnictwo plemników

U ryb (w warunkach zapłodnienia zewnętrznego) często dochodzi do konkurencji dwóch lub więcej samców o zapłodnienie ikry. W takich warunkach występuje współzawodnictwo pomiędzy plemnikami (sperm competition). Uwarunkowania współzawodnictwa dotyczą określonego behawioru samców oraz funkcjonowania jego układu rozrodczego [50]. Ostatnie lata przyniosły informacje na temat mechanizmów odpowiedzialnych za współzawodnictwo, wśród których wyróżniono odległość samca od uwolnionej do wody ikry, czas uwolnienia nasienia i jego koordynację z czasem uwolnienia ikry, ilość uwolnionych plemników, ich morfologia oraz szybkość ruchu [49, 57]. Zastosowanie CASA (Computer-assisted sperm analysis) umożliwiło wykazanie, że u ryb łososiowatych podstawowe znaczenie dla współzawodnictwa plemników ma względna szybkość ich ruchu w przeciwieństwie do czasu ruchu lub koncentracji plemników [19]. Co więcej, wykazano zróżnicowanie ruchliwości plemników w płynach jajnikowych różnych samic [51]. Wyniki te sugerują, że w warunkach naturalnego zapłodnienia samice mogą do pewnego stopnia wpływać na współzawodnictwo plemników. Zjawisko to powinno być brane pod uwagę w pracach wylęgarni, ponieważ może doprowadzić do obniżenia zmienności genetycznej materiału zarybieniowego [4].

Wpływ stresu na jakość nasienia

W warunkach hodowlanych nie da się uniknąć stresu ryb, szczególnie z powodu przenoszenia ryb oraz ich zagęszczenia, a także transportu. Okazuje się, że warunki stresowe mogą istotnie obniżać parametry jakościowe nasienia. Allyn i in. [1] stwierdzili obniżenie osmolalności plazmy nasienia basa białego w wyniku długotrwałego (30–44 h) transportu. Zjawisko to skutkowało indukcją aktywacji plemników i w konsekwencji obniżeniem ich jakości. Duże znaczenie dla hodowli ryb miało odkrycie genetycznego zróżnicowania wrażliwości na stres [44]. Wyniki tych prac były przesłanką do rozpoczęcia selekcji pod kątem doboru ryb charakteryzujących się obniżonym poziomem stresu (niskim poziomem kortyzolu w odpowiedzi na stresor). Jednakże do tej pory nie udało się udowodnić lepszego funkcjonowania układu rozrodczego w wyniku zastosowania omawianej selekcji [5, 45].

Nowe techniki badania jakości nasienia

Analiza ruchliwości plemników za pomocą CASA

Computer-aided-sperm analysis, lub computer-assisted sperm analysis (CASA) jest coraz częściej stosowaną obiektywną analizą ruchliwości plemników, polegającą na rejestracji obrazów mikroskopowych oraz ich komputerowej analizie prowadzącej do opracowania wielu charakterystyk dotyczących szybkości i trajektorii ruchu plemników. Subiektywna ocena nasienia ryb jest wyjątkowo utrudniona z powodu krótkiego czasu ruchu oraz małych rozmiarów plemników. Dlatego zastosowanie CASA do badań nasienia ryb ma szczególne uzasadnienie [26, 48]. Wykazano między innymi zależność pomiędzy parametrami ruchu plemników a zawartością kwasu askorbinowego w nasieniu pstrąga tęczowego [14] oraz opisano zmiany ruchliwości plemników minoga morskiego w zależności od stężeń NaCl, KCl oraz pH [9]. Dokonano także szczegółowej analizy ruchliwości plemników ryb w warunkach kriokonserwacji [38, 39]. Wykorzystano także CASA do monitorowania wpływu zanieczyszczeń, w szczególności metali ciężkich oraz azotanów i azotynów, na jakość nasienia [6, 17, 25]. Zastosowanie CASA umożliwiło także opisanie różnic pomiędzy charakterystyką ruchu plemników uzyskanych z jąder oraz poprzez wycieranie, szczególnie w zakresie liniowości ruchu [33] oraz pozwoliło na ilościowe opisanie zmian w charakterze ruchu plemników uzyskanych *post mortem* [15].

Analiza fragmentacji DNA za pomocą analizy komet

Analiza komet (Comet assay) lub analiza elektroforetyczna pojedynczych komórek (single cell gel electrophoresis assay) jest efektywną metodą szacowania uszkodzeń DNA komórek. Zasada analizy komet opiera się na wykorzystaniu zdolności pociętych zdenaturowanych fragmentów DNA do migracji w polu elektrycznym. Migrujące fragmenty DNA po wybarwieniu mają kształt podobny do ogona

komety, którego kształt odzwierciedla stopień i charakter uszkodzeń DNA. Analiza komet znalazła szerokie zastosowania w badaniach genotoksycznych oraz naprawy DNA i monitoringu wpływu ksenobiotyków na środowisko i organizm ludzki [43]. Pierwsze prace, w których zastosowano analizę komet plemników ryb, dotyczyły wykazania fragmentacji DNA w wyniku kriokonserwacji [36, 58]. Zastosowanie omawianej metody umożliwiło wykazanie genotoksycznego wpływu bisaziru na plemniki minoga morskiego [13]. Podobny wpływ na DNA plemników wywierało promieniowanie UV [16]. Wyniki te wskazują, że analiza komet może być zastosowana do oszacowania skuteczności inaktywacji genomu plemników, co może mieć znaczenie w optymalizacji metodyk przeprowadzenia gynogenezy u ryb.

Charakterystyka i konserwacja nasienia manipulowanych genetycznie i hormonalnie ryb

Manipulacje genomowe, takie jak gynogeneza i poliploidyzacja, są prostymi biotechnikami stosowanymi w rybactwie w celu uzyskiwania populacji jednopłciowych (w przypadku determinacji płci XY) oraz osobników sterylnych. Znacznie trudniejszą do przeprowadzenia i dającą gorsze efekty manipulacją genomową jest androgeneza, czyli uzyskanie potomstwa w oparciu wyłącznie o materiał genetyczny plemnika. Skuteczna androgeneza może mieć duże znaczenie w odzyskaniu gatunków lub populacji, które wyginęły, pod warunkiem posiadania zamrożonego i przechowywanego w banku genów nasienia. Badania Babiaka i in. [3] wykazały możliwość uzyskania androgenetycznych pstrągów tęczowych zarówno przy zastosowaniu nasienia świeżego, jak i kriokonserwowanego. Androgenetyczne samce YY (tzw. supersamce) podchowano do stadium dojrzałości płciowej, dzięki czemu możliwa była szeroka charakterystyka nasienia. Nasze badania wykazały [32], że zarówno odsetek plemników ruchliwych, jak i parametry motoryki ruchu (CASA), nie odbiegały istotnie od wartości określonych w nasieniu normalnych samców (XY). Również wartość biologiczna plemników zarówno świeżych, jak i kriokonserwowanych była na zbliżonym poziomie [34]. Wyniki te mają szczególne znaczenie w perspektywie szansy ochrony zagrożonych gatunków, zwłaszcza wobec wykazania możliwości skutecznej androgenezy międzygatunkowej w obrębie ryb karpiowatych [35].

Szczególne znaczenie komercyjne ma możliwość uzyskiwania jednopłciowych populacji samiczych ryb łososiowatych [18, 20, 27, 47]. Samice dojrzewają płciowo później od samców, po osiągnięciu masy ciała ryby handlowej, a zatem lepsza jest wydajność rzeźna i wykorzystanie paszy na przyrost masy części konsumpcyjnych. Jednopłciowe populacje samicze uzyskiwane są w oparciu o hormonalne odwrócenie płci, najczęściej przy zastosowaniu dodatku do paszy metylotestosteronu. Odwrócone płciowo samice, tzw. neosamce (XX), wykształcają funkcjonalne jądra, produkując plemniki wyłącznie z chromosomem X. Nie mają jednak z reguły nasieniowodów, co skutkuje możliwością uzyskania nasienia jedynie *post mortem* na drodze maceracji

gonad. Brak nasieniowodów uniemożliwia określenie stopnia dojrzałości plemników, co powoduje często przedwczesne pozyskanie nasienia o bardzo słabej ruchliwości plemników. Kobayashi i in. [27] wskazali na możliwość zdecydowanej poprawy ruchliwości plemników maskulinizowanych samic poprzez inkubację nasienia jądrowego w sztucznej plazmie nasienia o wysokim pH (pH 9,4). Nasze badania wykazały [29, 34], że rozrzedzenie nasienia jądrowego odwróconych płciowo samic pstrąga tęczowego plazmą nasienia uzyskaną z mlecza samców XY w stosunku 1 : 2, w sposób istotny wpływa na poprawę parametrów ruchu plemników. Podstawowe parametry ruchu nie różniły się istotnie od wartości określonych w nasieniu samców XY. Również wartość biologiczna plemników, mierzona odsetkiem wyklutych larw, zarówno przy użyciu nasienia świeżego, jak i kriokonserwowanego nie różniła się istotnie od plemników samców XY i YY. Ponadto rozrzedzone plazmą nasienia plemniki zachowały zdolność do ruchu w czasie 7-dniowego przechowywania, zarówno w atmosferze czystego tlenu, jak i bez dodatku tlenu w buforze immobilizującym, z 2,5% dodatkiem albuminy i 2, 5% stężeniem hemoglobiny, po uprzednim natlenieniu roztworu immobilizującego.

Kriokonserwacja nasienia ryb

Badania dotyczące kriokonserwacji nasienia ryb od wielu lat cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem. Uważa się, że do tej pory opracowano skuteczne biotechniki głębokiego zamrażania nasienia około 250 gatunków ryb. Mimo iż nie należy spodziewać się, aby biotechnika ta w najbliższych latach została zastosowana na szeroką skalę w akwakulturze, to trudno ją przecenić w aspekcie zarówno ochrony zagrożonych wyginięciem gatunków lub lokalnych populacji, jak i zabezpieczenia materiału genetycznego cennych linii hodowlanych, uzyskanych na drodze wieloletnich prac genetycznych i selekcyjnych. Ostatnie badania dotyczące problematyki kriokonserwacji koncentrują się zarówno na możliwościach poprawy jakości i przydatności nasienia do głębokiego zamrażania [2, 23, 46, 53], jak i na opracowywaniu nowych rozcieńczalników oraz użycia różnych krioprotektorów [21, 22, 38, 39, 52]. Między innymi, sugeruje się możliwość poprawy jakości plemników i integralności błon plazmatycznych poprzez dodatek do paszy niezbędnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [2, 46, 53]. Nasze badania wykazały, że o sukcesie kriokonserwacji może decydować sposób pozyskiwania nasienia. Pobieranie nasienia pstrąga tęczowego metodą kateteryzacji, bezpośrednio z nasieniowodów, zaowocowało uzyskaniem ponad 80% wyklucia z ikry zapładnianej kriokonserwowanym nasieniem oraz bardzo wyrównanymi wynikami dotyczącymi 25 prób nasienia [23].

Do niedawna dimetylosulfotlenek (DMSO) był najpowszechniej stosowanym krioprotektorem w głębokim zamrażaniu nasienia ryb. Ostatnio jednak coraz większe zainteresowanie budzi metanol, jako czynnik krioochronny. Nasze badania przeprowadzone przy współpracy z naukowcami węgierskimi wykazały jego przydatność do kriokonserwacji nasienia jesiotra syberyjskiego [21]. Metanol okazał się najlepszym

krioprotektorem również w przypadku nasienia zagrożonego wyginięciem gatunku, jakim jest głowacica. Stosując ten krioprotektor uzyskaliśmy wylęg na poziomie ponad 84% [22]. Przydatność metanolu potwierdzona została także w kriokonserwacji nasienia wiosłonosa [24] oraz wybranych gatunków europejskich ryb karpiowatych [52]. Sugerowana jest także przydatność dodatku metyloksantyn (np. kofeiny) jako związków zwiększających ruchliwość i zdolność zapładniająca plemników [28, 47].

Na podstawie przedstawionych osiągnięć można wnioskować o istotnym postępie w wymienionych kierunkach badawczych. Można także zauważyć widoczny wkład polskich zespołów badawczych w rozwój wiedzy na temat biologii nasienia ryb. Zdaniem autorów dalsze badania powinny koncentrować się na pełnym wyjaśnieniu mechanizmu ruchliwości plemników oraz molekularnych podstawach zapłodnienia. Powinny być także kontynuowane prace, zmierzające do wprowadzenia kriokonserwacji do praktyki hodowlanej.

Literatura

[1] Allyn M.L., Sheehan R.J., Kohler C.C. 2001. The effects of capture and transportation stress on white bass semen osmolality and their alleviation via sodium chloride. *T. Am. Fish. Soc*. 130: 706–711.

[2] Asturiano J.F., Sorbera L.A., Carillon M., Zanuy S., Ramos J., Navarro J.C., Bromage N. 2001. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* 194: 173–190.

[3] Babiak I., Dobosz S., Goryczko K., Kuźmiński H., Brzuzan P., Ciesielski S. 2002. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology* 57: 1229–1249.

[4] Campton D.E. 2004. Sperm competition in salmon hatcheries: The need to institutionalize genetically benign spawning protocols. *T. Am. Fish. Soc*. 133: 1277–1289.

[5] Castranova D.A., King W., Woods L.C. 2005. The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and low cortisol responsive domesticated male striped bass. *Aquaculture* 246: 413–422.

[6] Chyb J., Kime D.E., Mikołajczyk T., Szczerbik P., Epler P., 2000. The influence of zinc on sperm motility of common carp – a computer assisted studies. Arch. Pol. Fish. 8: 5–14.

[7] Ciereszko A., Dabrowski K., Kucharczyk D., Dobosz S., Goryczko K., Glogowski J. 1999. The presence of uric acid, an antioxidantive substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiol. Biochem*. 21: 313–315.

[8] Ciereszko A., Dabrowski K., Lin F., Liu L. 1999. Protective role of ascorbic acid against damage to male germ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 56: 178–183.

[9] Ciereszko A., Dabrowski K., Toth G.P., Christ S.A., Glogowski J., 2002. Factors affecting motility characteristics and fertilizing ability of sea lamprey spermatozoa. Trans. Am. Fish. Soc. 131: 193–202.

[10] Ciereszko A., Kwasnik M., Dabrowski K., Piros B., Glogowski J. 2000. Chromatographic separation of trypsin-inhibitory activity of rainbow trout blood and seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 91–94.

[11] Ciereszko A., Piros B., Dabrowski K., Kucharczyk D., Łuczyński M.J., Dobosz S., Glogowski J. 1998. Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood. *J. Fish Biol*. 53: 1292–1305.

[12] Ciereszko A., Własow T., Dobosz S., Goryczko K., Glogowski J., 2004. Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period. *Theriogenology* 62: 1353–1364.

[13] Ciereszko A., Wolfe T., Dabrowski K. 2005. Analysis of DNA damage of sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by toxicant (Bisazir), UV and hydrogen peroxide. *Aquatic Toxicol*. 73: 128–138.

[14] Dabrowski K., Ciereszko A. 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquacult. Res*. 32: 623–638.

[15] Dietrich G.J., Kowalski R., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko, K., Ciereszko A. 2005. Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia. *Fish Physiol. Biochem*. 31: 1–9.

[16] Dietrich G.J., Szpyrka A., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K., Żakowski Ł., Ciereszko A. 2005. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1809–1822.

[17] Epler P., Chyb J., Kime D.E., Sokołowska-Mikołajczyk M. 2000. The effects of nitrites (NO_2) and nitrates (NO_3) on sperm motility of common carp in vitro. *Arch. Pol. Fish.* 8: 15–24.

[18] Fitzpatrick J.L., Henry J.C., Liley N.R., Devlin R.H. 2005. Sperm characteristics and fertilization success of masculinized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 249: 459–468.

[19] Gage M.J.G., Macfarlane C.P., Yeates S., Ward R.G., Searle .JB., Parker G.A. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: Relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr. Biol*. 14: 44–47.

[20] Geffen A.J., Evans J.P. 2000. Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 182: 61–72.

[21] Glogowski J., Kolman R., Szczepkowski M., Horvath A., Urbanyi B., Sieczyński P., Rzemieniecki A., Domagała J., Demianowicz W., Kowalski R., Ciereszko A. 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, BRANDT) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture* 211: 367–373.

[22] Glogowski J., Kowalewski M., Demianowicz W., Dietrich G., Wojtczak M., Kowalski R., Sarosiek B., Ciereszko A. 2003. Kriokonserwacja nasienia głowacicy (*Hucho hucho*). W Pstrągarstwo: produkcja, środowisko, profilaktyka. Pod red. (K. Goryczko). Wydawnictwo IRS: 85–96.

[23] Glogowski J., Kwasnik M., Piros B., Dabrowski K., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., Ciereszko A. 2000. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquacult. Res*. 31(3): 289–296.

[24] Horvath A., Urbanyi B., Mims S.D., Bean W.B., Gomelsky B., Tiersch T.R. 2006. Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. World Aquacult. Soc.* 37(4): 356–362.

[25] Kime D.E., Ebrahimi M., Nysten K., Roelants I., Rurangwa E., Moore H.D.M., Ollevier F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicol*. 36: 223–237.

[26] Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Huyskens G., Rurangwa E., Ollevier F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol*. C 130: 425–433.

[27] Kobayashi T., Fushiki S., Ueno K. 2004. Improvement of sperm motility of sex –reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. *Exp. Biol. Fish* 69: 419–425.

[28] Kopeika J., Kopeika E., Zhang T., Rawson D.M., Holt W.V. 2003. Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilized eggs in caffeine. *Cryobiology* 46: 43–52.

[29] Kowalski R., Dietrich G., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K., Demianowicz W., Judek J., Glogowski J., Ciereszko A. 2004. Nasienie gonadalne pstrąga tęczowego – sposoby rozrzedzania i ich wpływ na ruchliwość plemników. W: Pstrągarstwo: problemy prawne, zdrowotne i jakościowe. Pod red. K. Goryczko. Wydawnictwo IRS: 67–73.

[30] Kowalski R., Glogowski J., Kucharczyk D., Goryczko K., Dobosz S., Ciereszko A. 2003. Proteolytic activity and electrophoretic profiles of proteases from seminal plasma of teleosts. *J. Fish Biol.* 63: 1008–1019.

[31] Kowalski R., Glogowski J., Kucharczyk D., Mak M., Dobosz S., Zakes Z., Ciereszko A. 2004. Characterization of gelatinolytic activity in seminal plasma of some teleost fish. *Aquacult. Int*. 12: 57–68.

[32] Kowalski R., Glogowski J., Sarosiek B., Ciereszko A., Wojtczak M., Judek J., Cejko B. 2004. Podstawowe wyznaczniki jakościowe i parametry biochemiczne nasienia heterogametycznych i homogametycznych pstrągów tęczowych. W: „Biologia rozrodu oraz zdrowie reprodukcyjne człowieka" (pod red. W. Kuczyńskiego): 156–157.

[33] Kowalski R.K, Hliwa P, Andronowska A., Król J., Dietrich G.J., Wojtczak M., Stabiński R., Ciereszko A. 2006. Semen biology and stimulation of milt production in the European smelt (*Osmerus eperlanus* L.). *Aquaculture* 261: 760–770.

[34] Kowalski R.K., Sarosiek B., Judek J., Dobosz S., Kuźmiński H., Glogowski J. 2006. Możliwości krótko- i długookresowego przechowywania nasienia manipulowanych genetycznie pstrągów tęczowych. W: „Pstrągarstwo – Hodowla, manipulacje genetyczne, zagadnienia prawne, ochrona zdrowia" (pod red. H. Kuźmińskiego). Wyd. IRŚ w Olsztynie: 97–107.

[35] Kucharczyk D. 2002. Rozród kontrolowany i androgeneza wybranych gatunków ryb karpiowatych. Wydawnictwo UWM Olsztyn, Rozprawy i Monografie 63: 7–80.

[36] Labbe C., Martoriati A., Devaux A., Maisse G. 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol. Reprod. Dev*. 60: 397–404.

[37] Lahnsteiner F. 2007. Characterization of seminal plasma proteins stabilizing the sperm viability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Reprod. Sci.* 97: 151–164.

[38] Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., Patzner R. 1996. The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *J. Appl. Ichthyol*. 12: 99–106.

[39] Lahnsteiner, F., Mansour, N., Weisman, T. 2002. The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (*Gadidae*, *Teleostei*). *Cryobiology* 45: 195–203.

[40] Lee K.J., Dabrowski K. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture* 230: 377–389.

[41] Mak M., Mak P., Olczak M., Szalewicz A., Glogowski J., Dubin A., Wątorek W., Ciereszko A. 2004. Isolation, characterization, and cDNA sequencing of α-1-antiproteinase-like protein from rainbow trout seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta Regular Papers* 1671: 93–105.

[42] Mochida K., Kondo T., Matsubara T., Adachi S., Yamauchi K. 1999. A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev. Growth Different*. 41: 619–627.

[43] Morris I.D, Ilott S., Dixon L., Brison D.R. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum. Reprod*. 17: 990–998.

[44] Overli O., Pottinger T.G., Carrick T.R., Overli E., Winberg S. 2002. Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. *J. Exp. Biol*. 205: 391–395.

[45] Pottinger T.G., Carrick T.R. 2000. Indicators of reproductive performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (WALBAUM) selected for high and low responsiveness to stress. *Aquacult. Res*. 31: 367–375.

[46] Pustowka C., McNiven M.A., Richardson G.F., Lall S.P. 2000. Source of dietary lipid affects sperm membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (WALBAUM) after cryopreservation. *Aquacult. Res*. 31: 297–305.

[47] Robles V., Cabrita E., Cunado S., Herraez M.P. 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture* 224: 203–212.

[48] Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F., Nash J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1–28.

[49] Schulte-Hostedde A.I., Burness G. 2005. Fertilization dynamics of sperm from different male mating tactics in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Can. J. Zool*. 83: 1638–1642.

[50] Stoltz J.A., Neff B.D. 2006. Sperm competition in a fish with external fertilization: the contribution of sperm number, speed and length. *J. Evol. Biol.* 19: 1873–1881.

[51] Urbach D., Folstad I., Rudolfsen G. 2005. Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Behav. Ecol. Sociobiol*. 57: 438–444.

[52] Urbanyi B., Szabo T., Miskolczi E., Mihalffy S., Vranovics K., Horvath A. 2006. Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. *J. Appl. Ichthyol*. 22: 201–204.

[53] Vassallo-Agius R., Watanabe T., Yoshizaki G., Satoh S., Takeuchi Y. 2001. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n-3 essential fatty acid-deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. *Fish. Sci.* 67: 818–827.

[54] Wojtczak M., Ciereszko A. 2005. Improvement of electrophoretic detection of antitrypsin activity in fish blood and seminal plasma. *Electrophoresi*s 26: 514–516.

[55] Wojtczak M., Glogowski J., Kołdras M., Kucharczyk D., Ciereszko A. 2003. Characterization of proteinase inhibitors of seminal plasma of cyprinids. *Aquatic Liv. Resour*. 16: 461–465.

[56] Wojtczak M., Dietrich G.J., Ciereszko A. 2005. Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma. *Fish Shellfish Immunol.* 19: 387–391.

[57] Yeates S., Searle J., Ward R.G., Gage M.J.G. 2007. A two-second delay confers first-male fertilization precedence within in vitro sperm competition experiments in Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 70: 318–322.

[58] Zilli L., Schiavone R., Zonno V., Storelli C., Vilella S. 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology* 47: 227–235.

Advances in basic and applied studies on biology of the fish semen

Keywords: fish, reproduction, spermatozoa, seminal plasma, androgenesis, sex reversion, cryopreservation

Summary

Papers published in the last decade revealed a significant progress in basic and applied studies on biology of fish semen. New seminal plasma compounds were characterized, including proteins such as proteinase inhibitors and transferrin. Research on sperm competition were extended and linked to studies of evolution. The effects of stress on gamete quality were identified and described. Advanced methods of sperm motility and DNA fragmentation assessments were introduced to studies on the fish semen. The semen obtained from genetically and hormonally modified fish has been characterized. Further progress concerning sperm cryopreservation was also achieved.

Postępy Nauk Rolniczych nr 3/2007: 135–147

Rozród zwierząt nieudomowionych – osiągnięcia nauki krajowej i jej perspektywy na tle badań światowych

[1]Marek Koziorowski, [2]Zygmunt Giżejewski, [1]Przemysław Gilun
[1]Zakład Fizjologii i Rozrodu Zwierząt, Uniwersytet Rzeszowski,
Werynia 502, 36-100 Kolbuszowa,
[2]Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, 10-747 Olsztyn ul. Tuwima 10.
e-mail: mkozioro@univ.rzeszow.pl

Słowa kluczowe: rozród, zwierzęta nieudomowione, sezonowość

Pierwsze doniesienia o rozrodzie zwierząt dotyczyły gatunków nieudomowionych. W IV w. p.n.e. Arystoteles w „Historia Animalium" [1] zwrócił uwagę, że jeleń jest zwierzęciem rozmnażającym się sezonowo. We wczesnym średniowieczu decyzjami władców i wielkorządców powoływano urzędy łowczych, bobrowych, sokolników – osób biegłych w sztukach łowieckich, których zadaniem była nie tylko organizacja polowań, ale również dbałość o liczebność i kondycję wybranych gatunków łownych. Działania takie można nazwać gospodarką łowiecką, która z jednej strony miała zabezpieczyć ciągłość gatunków, a z drugiej strony stwarzała możliwość pozyskiwania zwierzyny nie tylko dla rozrywki możnych, ale i na potrzeby armii królewskich. Z kronik Długosza znane są opisy łowów królewskich przed bitwą pod Grunwaldem, kiedy pozyskano niewyobrażalną na dzisiejszą skalę zwierzynę w celu zabezpieczenia żywności dla walczącego rycerstwa.

Możnowładcy poprzez wydawane edykty, zapewniali sobie wyłączność polowań na określone gatunki, tworząc podstawy ochrony gatunkowej zwierząt w Polsce. Pomimo to nie udało się ochronić wszystkich gatunków, które przy niskiej rozrodczości, zmieniającym się środowisku oraz kurczącej się bazie żerowej, spowodowanej działalnością człowieka, wyginęły bezpowrotnie (tur).

Wszystkie zwierzęta domowe wywodzą się od zwierząt dzikich. W postępującym procesie udomowiania (domestykacji) poszczególnych gatunków do dalszego rozrodu kierowano zwierzęta charakteryzujące się najlepszymi parametrami użytkowymi. W miarę stałe warunki bytowania, nieograniczony dostęp do pokarmu, a więc możliwość odchowania potomstwa w okresach niezależnych od zewnętrznych wa-

runków środowiskowych spowodowały zmiany w regulacjach neurohormonalnych udomowionych zwierząt, wywołując policykliczność oraz całoroczną zdolność do rozrodu. Ich dalsze celowe krzyżowanie na drodze sztucznego doboru pomiędzy wybranymi osobnikami doprowadziło do wyselekcjonowania wielu ras o określonym typie użytkowania. Mechanizmy fizjologiczne z powodu jednostronnej selekcji uległy radykalnym przemianom, pozwalającym na zwiększenie mleczności, mięsności, nieśności, wydajności wełny, bez negatywnych konsekwencji tych zmian, szczególnie w aspektach rozrodu i odporności osobniczej.

Poznanie mechanizmów biologii rozrodu zwierząt nieudomowionych obejmuje liczne zagadnienia natury poznawczej i aplikacyjnej. Badania z użyciem zwierząt dzikich wymagają zastosowania odpowiednich technik badawczych, wynikających z odmienności behawioralnych (reakcja na stres) oraz ograniczonych możliwości ich pozyskania. Z wymienionych powodów zwierzęta nieudomowione są obiektem badań wąskiej grupy specjalistów w kraju i zagranicą, a stan wiedzy jest daleko niższy niż o zwierzętach domowych. Odrębne znaczenie ma wartość aplikacyjna prowadzonych prac nad rozrodem. Wypracowane nowoczesne metody biotechnologii rozrodu mogą mieć zastosowanie zarówno w hodowlach zamkniętych, jak również w aktywnej ochronie ginących gatunków, poprzez tworzenie ich rezerw genetycznych [34].

Coraz większe zainteresowanie hodowlą zwierząt nieudomowionych wynika z rynkowego zapotrzebowania na wysokiej jakości mięso o niskiej zawartości cholesterolu i specyficznych walorach odżywczych, smakowych i zdrowotnych. Innymi nie mniej ważnymi argumentami do rozwijania takich hodowli są wszelkie trofea oraz pozyskanie skór jako cennego i unikalnego surowca na różne wyroby. Hodowla ta wymaga jednak opracowania nowych metod indywidualnie dla poszczególnych gatunków, polegających na dostosowaniu istniejących technologii stosowanych u zwierząt domowych. Poza różnymi systemami utrzymania zwierząt, żywienia czy też pielęgnacji znaczenie priorytetowe ma prawidłowa organizacja sterowania rozrodem.

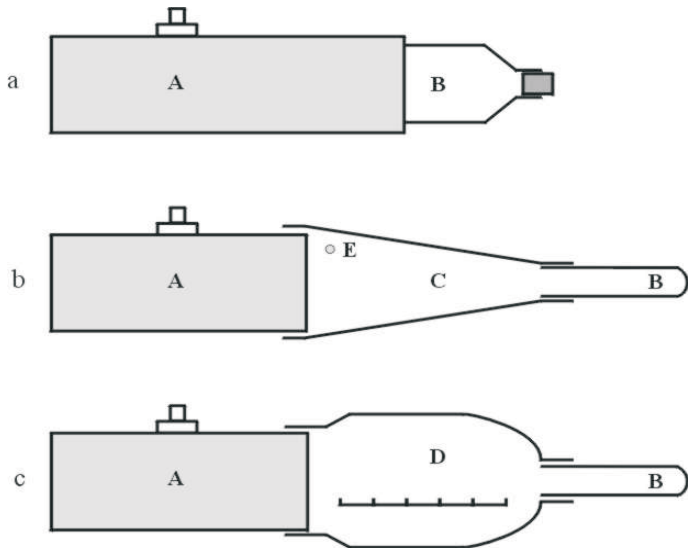
Dynamicznie rozwijająca się hodowla jeleniowatych od kilku dekad na świecie, a w związku z nowelizacją prawa łowieckiego [20] także w Polsce, spowodowała zwiększenie zainteresowania inseminacją nasieniem dawców o wybitnych walorach zarówno hodowlanych jak i użytkowych. Sztuczne unasienianie daje możliwości szybkiego doskonalenia stada, pozwalającego na osiąganie sukcesów w hodowli zarówno jelenia szlachetnego jak i daniela.

Stan wiedzy dotyczącej wczesnych etapów badań nad rozrodem w kraju i na świecie często ograniczał się do charakterystyki poszczególnych gatunków oraz podstawowych informacji, jakimi były długość ciąży, ilość wydanego potomstwa oraz przebieg okresu rujowego, ciąży, porodu i okresu poporodowego. Częstymi czynnikami uniemożliwiającymi prowadzenia bardziej szczegółowych badań, poza utrudnieniami wynikającymi z życia w warunkach naturalnych były niski poziom technik laboratoryjnych oraz brak nowoczesnego, dostępnego obecnie sprzętu. Opisy procesów związanych z rozrodem wynikały raczej z bezpośrednich obserwacji myśliwych i leśników, niż z badań *sensu stricte* naukowych [21, 19, 75, 8].

W okresie powojennym ośrodkiem naukowym w Polsce, który uzyskał szerokie uznanie z powodu prowadzonych badań nad rozrodem jeleniowatych, była Stacja Badawcza PAN w Popielnie. Inicjatorem podjęcia tej tematyki był prof. Zbigniew Jaczewski, uznany w świecie autorytet w dziedzinie rozrodu zwierząt dzikich. Tematyka badań dotyczyła pobierania i oceny nasienia przy użyciu sztucznej pochwy i post-mortem od jelenia i łosia [25, 26, 27, 58, 59, 60] oraz oceny ilościowej i jakościowej spermatogenezy w cyklu rocznym [28, 30].

W kręgu zainteresowań znalazły się również zmiany hormonalne i ocena biochemiczna płynów nasiennych [4, 39, 42, 50, 80, 81, 82] oraz możliwości mrożenia nasienia wraz z inseminacją [37, 59, 60]. Badania te oraz określenie przy użyciu ultrasonografu czasu owulacji u łań [23] pozwoliły na stworzenie podwalin pod praktyczne stosowanie zabiegów sztucznego unasieniania u tego gatunku. W Popielnie przeprowadzono również wiele badań zmienności nakładania i zrzucania poroża przez byki jelenia, których cykle są silnie skorelowane z sezonowością rozrodu i podlegają tym samym czynnikom fotoperiodycznym [35, 38, 39, 40, 42].

W dorobku tej Stacji na szczególną uwagę zasługuje fakt, że badania te były pionierskimi i są często cytowane w piśmiennictwie światowym. Poza wieloma znaczącymi sukcesami, w Popielnie po raz pierwszy w świecie pozyskano nasienie byków jeleni przy użyciu sztucznej pochwy [58], uzyskano potomstwo jeleni ze sztucznego unasieniania [37]. Pierwowzór sztucznej pochwy używany do dnia dzisiejszego został zmodyfikowany i obecnie stosowany model umożliwia rozdzielenie frakcji ejakulatu w zależności od sezonu rozrodczego – białej, żółtej i szarej (rys. 1) [25, 27]. Opraco-



Rysunek 1. Schemat sztucznej pochwy do pobierania ejakulatów od byków jeleniowatych: a) klasyczna sztuczna pochwa wg. Krzywińskiego [58], b) sztuczna pochwa zmodyfikowana wg. Giżejewskiego [25, 27], c) sztuczna pochwa do obserwacji przebiegu ejakulacji

wana metoda pozwala na wydzielenie frakcji nasiennej, którą wyłącznie poddaje się kriokonserwacji (Giżejewski, Glogowski prace w toku). Prowadzone aktualnie prace nad stosowaniem nowoczesnych rozcieńczalników nasienia jeleni (Biociphos®, Triladyl®), pozwolą na udoskonalenie procesu mrożenia nasienia u innych jeleniowatych zagrożonych wyginięciem, co umożliwi tworzenia ich rezerw genetycznych. Podstawą prowadzenia kriokonserwacji nasienia jeleni było poznanie sezonowych zmian ilościowych i jakościowych cech nasienia oraz koncentracji hormonów steroidowych, co pozwoliło na określenie optymalnego okresu kolekcji nasienia do mrożenia [30, 50]. Ważnym osiągnięciem w dziedzinie rozrodu jeleni było uzyskanie pierwszych w świecie zarodków łań jelenia szlachetnego do embriotransferu [61]. Poza jeleniem szlachetnym określono wiele danych dotyczących rozrodu, a zwłaszcza charakterystyki nasienia sarny i łosia [59, 60]. Sarna, podobnie jak łoś, jest gatunkiem bardzo trudnym do hodowli w warunkach fermowych, ze względu na wybitną wybiórczość pokarmową. Jest to główna przyczyna braku zaawansowanych badań nad rozrodem tych gatunków.

Na szczególną uwagę spośród rodzimych gatunków zwierząt nieudomowionych zasługuje największy europejski ssak – żubr (*Bison bonasus*) oraz największy euroazjatycki gryzoń – bóbr (*Castor fiber*). W niedalekiej przeszłości obydwa te gatunki były zagrożone całkowitym wyginięciem, co było powodem umieszczenia ich w czerwonej księdze gatunków chronionych [34]. Wprowadzona ochrona oraz podjęte badania nad biologią rozrodu tych gatunków, spowodowały zanik widma zagłady i obecny stan żubrów przekracza 3000 sztuk [57], z których ok. 900 sztuk żyje w Polsce. W przypadku bobra, stan jego populacji przekroczył już kilka lat temu 20000 osobników i jego liczebność stale rośnie, co wskazuje, iż w najbliższej przyszłości zostanie on wciągnięty na listę gatunków łownych.

Zarówno w przeszłości jak i obecnie badania nad rozrodem żubra są ograniczone z powodu ścisłej ochrony tego gatunku. Innym utrudnieniem jest specyficzny behawior tych dużych i silnych zwierząt niosący ryzyko wypadku podczas bezpośredniego kontaktu, co w szczególnych przypadkach wymaga stosowania głębokiej narkozy. Z przeglądu literatury [41] wynika, że do 1950 roku z zakresu rozrodu żubrów opublikowano w Europie tylko 11 prac, które dotyczyły w głównej mierze badań nad krzyżowaniem żubra z bydłem w celu otrzymania hybrydów międzyrodzajowych. Badania nad przebiegiem okresu kryć oraz struktury wiekowej obu płci opisał Wróblewski [87]. Bardziej szczegółowe obserwacje rozrodu wykonał Jaczewski [36], zwracając szczególną uwagę na przebieg rui, długość ciąży oraz zależność okresu kryć (wycieleń) od pory roku.

Od chwili ponownego wprowadzenia żubrów w 1952 roku do Puszczy Białowieskiej, prace te były kontynuowane na zwiększającej się z roku na rok liczbie osobników [22]. Powstało wiele opisów i charakterystyk, od areałów osobniczych byków i krów, ich zachowania się w czasie rui, osiągania dojrzałości płciowej, udziału w rozrodzie [12, 53, 56], po kompleksowe opracowania behawioralne [15].

Ze względu na konieczność prowadzenia selekcji żubrów, stał się możliwy dostęp do prób układu rozrodczego pobieranego *post mortem*. Badania histologiczne jąder pozwoliły na określenie dojrzałości płciowej, która ma miejsce w wieku 4 lat [13] lub wcześniej, zwłaszcza w grupie byków o wyższej masie ciała z hodowli rezerwatowej [14]. Przeprowadzone badania ultrastrukturalne jąder pozwoliły na charakterystykę kanalików plemnikotwórczych i morfologię komórek Sertoliego w aspekcie osiągania wieku rozrodczego. Zwrócono również uwagę na liczne zmiany w jądrach, a zwłaszcza obrębie komórek Sertoliego, a także opisano wyspecjalizowane połączenia pomiędzy komórkami podporowymi mające związek z barierą krew-jądro oraz zbadano występowanie cyst na najądrzach [51, 71, 72]. Podobne analizy budowy histologicznej jąder żubra zostały wykonane przez Bombę [11], która opisała podobieństwa i różnice w stosunku do bydła domowego i mieszańców z żubrem.

Badania nad mieszańcami żubra z bydłem domowym zostały zainicjowane przez prof. Augusta Dehnela w Zakładzie Badania Ssaków PAN w Białowieży w roku 1958. Duży wkład w poznanie biologii rozrodu mieszańców wniosła Małgorzata Krasińska, której wyniki zostały zawarte w dwóch monografiach [54, 55] i miały istotne znaczenie dla prowadzenia późniejszego krzyżowania żubrów na szeroką skalę w PGR Łękno, koło Poznania. W latach 1974–1984 uzyskano tam 391 mieszańców o różnym udziale krwi żubra, od 12,5 do 87,5%. Pracami tymi kierował dr Edward Sumiński, który opracował wstępną metodę pobierania nasienia od żubrów i jego konserwację, co umożliwiło stosowanie sztucznego unasieniania [46, 83]. Dalsze badania nad rozrodem żubroni prowadził Zygmunt Giżejewski w Stacji Badawczej PAN w Popielnie w latach 1979–1991, gdzie uzyskano łącznie 245 cielaków z kryć naturalnych i inseminacji nasieniem bydła rasy Hereford, Charolais oraz Blonde de'Aquitaine po synchronizacji farmakologicznej rui prostaglandynami $F_{2\alpha}$ i spiralami PRID. Uzyskane wyniki w zakresie rozrodu dotyczyły; przebiegu rui i czasu owulacji, skuteczności zacieleń, długości ciąży, czasu inwolucji macicy, behawioru porodowego, składu mleka i behawioru podczas ssania [24]. Jezierski i in. [43] określili poziom testosteronu, progesteronu, estradiolu i LH w relacji do wybranych parametrów zachowania płciowego buhajów żubronia zróżnicowanych genotypowo i fenotypowo.

Pionierem badań nad rozrodem bobrów europejskich był prof. Wirgiliusz Żurowski, który od 1958 roku kierował jedyną do dziś w Polsce i Europie fermą tych zwierząt w Popielnie. W wyniku prób i błędów powstał model fermy, który uwzględniał złożone potrzeby pokarmowe i bytowe tego lądowo-wodnego gatunku. W wyniku przeprowadzonych badań wyjaśniono wiele procesów fizjologicznych związanych z rozrodem, zarówno w aspektach praktycznych, behawioralnych, jak i fizjologicznych [17, 18, 89]. Prace te kontynuowane są do dziś i dotyczą m.in. oceny jakościowej i ilościowej nasienia oraz mechanizmów spermatogenezy, zwłaszcza zmian w nasieniu w fazie spermiogenezy. Z przeprowadzonych ocen morfologicznych wynika, że nasienie bobra wykazuje silne zróżnicowanie nie tylko w obrębie

główki plemnika, ale również w części wstawki i witki. W procesie spermiogenezy, do fazy czapeczki różnicowanie się komórek jest podobne jak u innych ssaków, natomiast w fazie akrosomalnej, obserwowane jest powstawanie ponad 70 form morfologicznych główki plemnika [6, 7, 29].

Badania nad rozrodem dzika prowadzone były na Wydziale Weterynaryjnym we Wrocławiu, gdzie określono sezonowe zmiany jakości nasienia [47]. W ośrodku tym prowadzi się również badania nad mrożeniem nasienia zająca [48]. Określenie sezonowej zmienności koncentracji hormonów steroidowych u loszek świniodzika przybliżyło poznanie osłabienia płodności tej krzyżówki w okresie letnim i wykazało, że steroidogeneza ulega istotnemu zahamowaniu na poziomie androgenów [52].

U większości przedstawicieli rodziny jeleniowatych (*Cervidae*) klimatu umiarkowanego, sezon rozrodczy zaczyna się jesienią (wrzesień, październik), kiedy dzień świetlny ulega znacznemu skróceniu. Wyjątkiem jest sarna, u której okres rujowy rozpoczyna się pod koniec czerwca, ale obserwowana u niej opóźniona implantacja zarodka powoduje wydłużenie ciąży. Generalnie, u poszczególnych gatunków zwierząt dzikich czas występowania rui jest zsynchronizowany z długością ciąży tak, aby okres porodów przypadał na miesiące wiosenne.

Zmianom hormonalnym u samic towarzyszą odpowiednie zmiany w męskim układzie rozrodczym. Za hormon stymulujący sezonowe regulacje rozrodu u ssaków uznawana jest melatonina. Mechanizm jej syntezy, wydzielania i działania u ssaków został już dość dobrze opisany [74]. Wydaje się, że długość dnia i temperatura są głównymi czynnikami zaangażowanymi w aktywację procesów rozrodczych u zwierząt rozmnażających się sezonowo. Światło stymuluje siatkówkę i generowane impulsy poprzez jądro nadskrzyżowaniowe docierają do ośrodków podwzgórza, skąd uwalniana wazopresyna i oksytocyna może działać bezpośrednio na szyszynkę. Inna droga stymulacji występuje, kiedy wazopresyna i oksytocyna pobudza wydzielanie acetylocholiny (Ach), która poprzez noradrenalinę (NA), neuropeptyd Y (NPY) i sekretoneurynę działa pobudzająco na sekrecję melatoniny [79].

U zwierząt dziko żyjących, których aktywność rozrodcza ma miejsce podczas krótkiego dnia świetlnego, okres wydzielania melatoniny wydłuża się, co w konsekwencji powoduje aktywację częstotliwości pulsów GnRH w podwzgórzu oraz wzrost amplitudy pulsów LH i pobudzeniem gonad [70]. Zwiększony poziom melatoniny hamuje ujemne sprzężenie zwrotne pomiędzy estradiolem i generatorem pulsów GnRH. [69]. Nie wykazano bezpośredniego działania melatoniny na neurony GnRH, a wpływ na sekrecję GnRH odbywa się pośrednio poprzez pobudzenie obszaru przedsuteczkowatego podwzgórza, który bierze udział w sekrecji gonadotropin i aktywności gonad [32, 65, 69].

Badania Wiliamsa i in. [86] wykazały, iż zarówno u byka, jak i u łani jelenia szlachetnego w okresie sezonu rozrodczego struktury mózgowia, a zwłaszcza guzowata część przysadki mózgowej ma zdolność wiązania znakowanej jodem radioaktywnym melatoniny. Nie stwierdzono jednak obecności receptorów melatoniny

w podwzgórzu, przy obecności ich w przysadce. Wynika z tego, że wpływ melatoniny na regulacje sezonowości rozrodu jelenia może odbywać się dwoma szlakami: 1) poprzez hamowanie sekrecji prolaktyny w części guzowatej przysadki lub 2) poprzez stymulowanie części dystalnej przysadki do wydzielania gonadotropin. Badania Sempere i in. [78] wykazały, że melatonina podawana samicom sarny (kozom) w postaci implantów w okresie anestrus powodowała po 6 dniach istotny spadek koncentracji prolaktyny (do 20–30 ng · ml^{-1}) i progesteronu (do < 1ng · ml^{-1}), a sezon rozrodczy uległ przyspieszeniu o około 70 dni. Również Asher i in. [2, 3] uzyskali przyspieszenie sezonu rozrodczego u łań daniela oraz jelenia szlachetnego o 5 tygodni po podawaniu melatoniny.

Podawanie melatoniny w okresie ciąży u jelenia szlachetnego powodowało różne skutki w zależności od okresu, w którym rozpoczęto eksperyment. Wyniki uzyskane przez Ashera [3] świadczą o istotnym wpływie melatoniny na przebieg ciąży, mammogenezę, wystąpienie pierwszej rui po porodzie oraz na długość okresu międzyciążowego i są zależne od okresu, w którym rozpoczęto jej aplikację.

Generalnie status hormonalny procesów rozrodczych u jeleniowatych jest podobny jak u owiec. Wykazują one podobne sezonowe zmiany w systemach regulacyjnych, a skrócenie dnia poprzez wydłużenie sekrecji melatoniny wpływa u tryków bezpośrednio na przysadkę zwiększając syntezę FSH i LH [68] przy jednoczesnym zahamowaniu produkcji prolaktyny. Badania Lincolna i Clarka [68] wykazały również, że po uszkodzeniu połączeń podwzgórzowo-przysadkowych owce reagowały na egzogenną melatoninę spadkiem koncentracji prolaktyny, podobnie jak kontrolne z zachowaną osią podwzgórze-przysadka. Wyniki te wskazują na możliwość regulacji wydzielania prolaktyny, bez udziału podwzgórza.

Jednocześnie u kastrowanych tryków stymulowanych estradiolem w okresie rozrodczym istotny wzrost koncentracji LH po iniekcjach GnRH następował po 10 godzinach, natomiast w okresie anestrus po 36 godzinach. Analogicznie przeprowadzone badania w okresie anestrus wykazały, że egzogenna melatonina istotnie przyspiesza odpowiedź LH na GnRH [76]. Dowodzi to, że melatonina u owiec uczestniczy w zniesieniu ujemnego sprzężenia estradiolu z generatorem pulsów LH [76].

Lincoln i Clark [67] wykazali, że w okresie rozrodczym u owiec, struktury podwzgórzowe reaktywne na katecholaminy wykazują hamujący wpływ na syntezę prolaktyny. W okresie długiego dnia u obu grup owiec, którym zaaplikowano agonistów receptorów α_1 i dopaminowych (DA) nie zaobserwowano zmian w koncentracji PRL pomiędzy grupami. Uzyskane wyniki świadczą o możliwości stymulowania syntezy PRL z pominięciem podwzgórza, a melatonina nie jest jedynym czynnikiem hamującym syntezę prolaktyny.

Do prawidłowego działania układu endokrynnego zwierząt sezonowo rozmnażających się jest konieczne współdziałanie melatoniny z podwzgórzem, a układ adrenergiczny jest istotnym czynnikiem modulującym ten mechanizm. Obecność receptorów melatoniny w części guzowatej przysadki i braku ich w strukturach podwzgórza

u jelenia szlachetnego upoważnia autorów do wysunięcia przypuszczenia o wspomnianym podobieństwie regulacji rozrodczych u owcy i jeleniowatych.

Uznanie udziału układu adrenergicznego w regulacjach endokrynnych na poziomie regulacji mózgowych skłania do dalszych dociekań na temat możliwych dróg tej fizjologicznej regulacji. Noradrenalina (NA) i acetylocholina (Ach) uwalniane z zakończeń nerwowych nie są ostatecznym czynnikiem powodującym zwężenie lub rozszerzenie naczyń. Udowodniono, że tlenek azotu (NO) jest dominującym czynnikiem biorącym udział w grze naczynioruchowej [63]. Jednym z czynników wpływających na uwalnianie NO jest tlenek węgla (CO) [84]. Przy zatruciach CO obserwowano 9-krotny wzrost produkcji NO przez mózg [33]. Głównym źródłem CO w organizmie jest oksygenaza hemowa, która w czasie fotochemicznej reakcji rozkładu hemu, w siatkówce w czasie przepływu krwi przez jej naczyniówkę powoduje rozkład hemu do CO, biliwerdyny i Fe^{2+}. W warunkach fizjologicznych 0,5–1% hemoglobiny, która jest jego transporterem jest nietrwale związana z tlenkiem węgla. Występuje on w tkankach w stężeniach nanomolarnych [5].

Mechanizm działania CO opisano już w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia [45] i polega on głównie na aktywacji cyklazy guanylowej, co zwiększa syntezę cGMP w wielu komórkach. CO syntetyzowany przez komórki śródbłonka dyfunduje do warstwy mięśniowej naczynia krwionośnego i wzbudza tam syntezę cGMP. Powoduje to relaksację naczynia i zwiększony przepływ krwi [73, 77, 88].

W naczyniach mózgu, tlenek węgla bezpośrednio aktywuje zależne od wapnia kanały potasowe, co prowadzi do ich hiperpolaryzacji i relaksacji, a w efekcie końcowym, do rozszerzenia naczyń krwionośnych mózgu [64, 73].

W mózgu ssaków strukturami odpowiedzialnymi za dobowe i sezonowe regulacje w głównej mierze są odpowiedzialne struktury przodomózgowia i jądro nadskrzyżowaniowe. W obu tych strukturach stwierdzono obecność genów *per* i *cry* – genów rytmów dobowych, aktywowanych w zależności od długości dnia świetlnego poprzez melatoninę [31, 66]. Aktywacja tych genów odbywa się w zależności od ich umiejscowienia, w przodomózgowiu aktywacja następuje poprzez heterodimer białek BMAL-1 i NPAS2, który sprzężony z NADPH łączy się z promotorem genu *per* i *cry*. W jądrze nadskrzyżowaniowym aktywacja genów *cry* i *per* odbywa się poprzez przyłączenie dimeru CLOCK i BMAL1 [10]. Szczyt produkcji białek PER przypada na wczesne godziny ranne, natomiast CRY na wczesną noc. Produkt białkowy powyższych genów tworzy kompleks z kinazą kazeinową umożliwiający jego fosforylację. Maksymalne ilości tego ufosforylowanego kompleksu w cytoplazmie pojawiają się w połowie dnia, kiedy jeszcze poziom PER, pomimo tendencji spadkowej, jest wysoki, a poziom CRY zaczyna wzrastać, co działa hamująco na ekspresję genów *cry* i *per*. Równocześnie kompleks ten działa hamująco na ekspresję czynnika hamującego ekspresję genów *bmal1* i *clock*, czego wynikiem jest stymulacja syntezy białka BMAL1 i CLOCK szczególnie w jądrze nadskrzyżowaniowym, co skutkuje zwiększoną syntezą melatoniny. Jednocześnie kompleks PER/CRY odziałuje na tkanki

docelowe pobudzająco lub hamująco. Podobny mechanizm opisano w części guzowatej przysadki, który jest głównym regulatorem wydzielania prolaktyny. Zwiększona ilość ufosforylowanego kompleksu CRY/PER hamuje wydzielanie prolaktyny w okresie jesienno-zimowym [9, 44, 65]. Przodomózgowie, podobnie jak jądro nadskrzyżowaniowe, jest włączone w rytm dobowy, co uwidacznia się w różnych stanach organizmu, takich jak sen, aktywność, spożywanie pokarmu. Obydwa te obszary ściśle ze sobą współdziałają pobudzając lub hamując ich funkcje fizjologiczne. Molekularny zegar komórki *per/cry* w przodomózgowiu aktywowany jest przez heterodimer białkowy NPAS2-BMAL1. Mediatorem dimeryzacji tego kompleksu jest brak CO. Wzrost stężenia CO > 1 μM powoduje jego przyłączenie do domeny w białku NPAS2, w składzie którego znajdują się cząsteczki hemowe, co powoduje rozpad kompleksu, zahamowanie ekspresji genów *pre* i *cry* oraz spadek ich ilości [10, 16].

W ciemności narasta synteza białka PER osiągając maksimum w godzinach porannych. Szczytowa akumulacja tego białka w komórce powoduje zatrzymanie ekspresji genu *bmal1*. W efekcie tego procesu wstrzymana zostaje synteza PER. W celu przywrócenia zrównoważonej oscylacji białko NPAS2 łączy się z tlenkiem węgla (powstaje pod wpływem oksygenazy hemowej stymulowanej przez światło dzienne), co umożliwia oddysocjowanie białek BMAL1 w celu zakumulowania jego odpowiedniej ilości w komórce, aby po osiągnięciu szczytu zainicjować ponowną heterodimeryzację z NPAS2. Białko NPAS2 w ciągu dnia jest blokowane poprzez przyłączenie CO w celu uniemożliwienia procesu heterodimeryzacji z BMAL1. Kiedy BMAL1 osiąga maksymalną akumulację w komórce NADPH odłącza CO od grup hemowych NPAS2 przywracając zdolność heterodimeryzacji i zdolność aktywacji genu *per* [16, 65, 66]. Wydaje się, że indukowane światłem przy udziale CO zmiany ilościowe białek PER i CRY są głównym czynnikiem kodującym sygnał melatoninowy. Generują one długotrwałe zmiany zegara biologicznego powodujące w okresie krótkiego dnia świetlnego spadek poziomu prolaktyny i wzrost syntezy gonadotropin. Odwrotne zjawisko obserwuje się w okresie długiego dnia.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest prób wyjaśnienia możliwości wpływu CO powstającego w oku pod wpływem promieni świetlnych i możliwości przeciwprądowego jego przenikania z zatoki żylnej oka do przechodzących przez nią naczyń tętniczych bezpośrednio doprowadzających krew do mózgu. Tym samym brak jest danych o informowaniu struktur podwzgórzowych o zmieniającej się długości dnia drogą chemiczną. Wydaje się, że zbadanie tego mechanizmu wraz ze zmianami wydzielania melatoniny i ekspresji genów oraz białek zaangażowanych w te procesy wniosłoby wiele nowych aspektów w zrozumieniu sezonowej rozrodczości i niepłodności; byłby to trwały wkład nauki polskiej do światowego skarbca wiedzy o rozrodzie i jego sezonowości.

Badania nad rozrodem zwierząt nieudomowionych są prezentowane głównie na dwóch Światowych kongresach: „Deer Biology Congress", który odbywa się co

cztery lata, oraz na „International Union of Game Biologists", który odbywa się co dwa lata. Prezentowane tam prace dotyczące rozrodu wskazują na stałe trendy, których celem jest osiągnięcie stanu wiedzy porównywalnej do wiedzy na temat rozrodu zwierząt domowych. Uzyskiwane wyniki badań wskazują jednak, iż nie jest możliwe tak dobre poznanie tej dziedziny nauk u dzikich zwierząt, pomimo dobrej współpracy wielu biologów, lekarzy weterynarii, endokrynologów i specjalistów pokrewnych dziedzin, zarówno w Polsce jak i na świecie.

Literatura

[1] Arystoteles. Historia Animalium. PWN, Warszawa, 1982.

[2] Asher G.W., Barrel G.K., Adam J.L., Staples L.D. 1988. Effects of subcutaneous melatonin implants on reproductive seasonality of farmed fallow deer (*Dama dama*). *J. Reprod. Fertil.* 84: 679–691.

[3] Asher G.W., Veldhuizen F.A., Morrow C.J., Duganzich D.M. 1994. Effects of exogenous melatonin on prolactin secretion, lactogenesis and reproductive seasonality of adult female red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil*. 100: 11–19.

[4] Bartecki R., Jaczewski Z. 1983. Seasonal variation in the plasma androgens concentration of red deer. *Acta Theriol*. 28: 333–336.

[5] Bełtowski J., Jamroz A., Borkowska E. 2004. Oksygenaza hemowa i tlenek węgla w fizjologii i patologii układu krążenia. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 58: 83–99.

[6] Bierła J. 2007. Spermatogenesis and sperm morphology of European beaver *Castor fiber* L. Praca doktorska SGGW: 1–129.

[7] Bierła J., Giżejewski Z., Leigh C., Ekwall H., Söderquist L., Rodriguez- Martinez H., Zalewski K., Breed B. 2006. Sperm morphology of the European beaver *Castor fiber* – an example of rodent species with highly derived and pleiomorphic sperm population. *J. Morphol.* (in press).

[8] Bobek B., Morow K., Perzanowski K., Kosobucka M. 1992. Jeleń. Wyd. Świat, Warszawa.

[9] Boden M.J., Kennaway D.J. 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* 132: 379–392.

[10] Boehning D., Snyder S.H. 2002. Carbon monoxide and clocks. *Science* 298: 2339–2340.

[11] Bomba G. 1995. Badanie patomorfologiczne jąder żubroni. Praca doktorska ART w Olsztynie.

[12] Caboń-Raczyńska K., Krasińska M., Krasiński Z. 1983. Behaviour and daily activity rhythm of European bison in winter. *Acta Theriol.* 28: 273–299.

[13] Czykier E., Sawicki B., Krasińska M. 1999. Postnatal development of the European bison spermatogenesis. *Acta Theriol.* 44: 77–90.

[14] Czykier E., Krasińska M. 2004. Cases of spermiogenesis in young European bison. *Acta Theriol*. 49: 543–554.

[15] Daleszczyk K. 2002. Behawior rozrodczy żubrów (*Bison bonasus* L.). Praca doktorska, UWM Olsztyn.

[16] Dioum E.M., Rutter J., Tuckerman J.R., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M-A., McKnight S.L. 2002. NPAS2: gas-responsive transcription factor. *Science* 298: 2385–2387.

[17] Doboszyńska T., Żurowski W. 1981. Anatomical studies of the male genital organs of the European beaver. *Acta Theriol*. 26: 331–340.

[18] Doboszyńska T., Żurowski W. 1983. Reproduction of the European beaver. *Acta Zool. Fenica*. 174: 123–126.

[19] Dzięciołowski R., Pielowski Z. 1975. Łoś. PWRiL, W-wa.

[20] Dz. U. Nr 14 z 1997. Ustawa z dn. 10 stycznia 1997 r. O zmianie ustawy – Prawo Łowieckie, poz. 72, Art. 1 p. 2.

[21] Dzięgielewski S. 1973. Jeleń. PWRiL, W-wa.

[22] Gill J. 1999. Zarys fizjologii żubra. Severus, Warszawa.

[23] Giżejewski Z., Pędich M., Jaczewski Z., Bartecki R. 1993. Ultrasonographic control of ovarian function in red deer (*Cervus elaphus*) during the oestrus cycle. Deer in China Sheng (ed.): 350–355.

[24] Giżejewski Z. 1994. Badania nad rozrodem żeńskich hybrydów żubra (*Bison bonasus* L.) z bydłem domowym (*Bos taurus* L.) ze szczególnym uwzględnieniem czasu owulacji. Praca doktorska ART, Olsztyn.

[25] Giżejewski Z. 1996. Modifications of artificial vagina allowing to separate semen fractions and to observe some ejaculation details in red deer (*Cervus elaphus*). The Central Europ. Conf. on Animal Reprod., Olsztyn. *J. of Physiol. and Pharmacol*. 47(2), Suppl.1: Abs. 79.

[26] Giżejewski Z., Söderquist L., Rodriguez-Martinez H. 1998. Post-mortem examination of genital organs and characteristics of epididymal spermatozoa from wild red deer stags *Cervus elaphus carpaticus* var. *montanus*. Proc. 2nd World Conf. Mt. Ungulates, St. Vincent (Italy): 121–128.

[27] Giżejewski Z. 2000. Improving the artificial vagina for the separation of fractions in the ejaculate of red deer. *Animal Science Pap. Rep*. 2: 145–151.

[28] Giżejewski Z., Mayntz M., Jędryczko R. 2000. A screening study of microflora in the semen of wild and farmed red deer (Cervus elaphus L.). *Animal Sci. Pap. Rep*. 4: 245–255.

[29] Giżejewski Z., Zduńczyk S., Niewęgłowski H., Raś A. 2001. Methods of determining the sex of the European beaver (*Castor fiber* L.). Congress of the International Union of Game Biologists, Limassol, Abs. 101.

[30] Giżejewski Z. 2002. Effect of season on the qualitative and quantitative properties of red deer (*Cervus elaphus* L.) semen, taking into consideration sexual behavior. Dissertations and Monographs UWM Olsztyn: 1–49.

[31] Green C.B., M. Menaker. 2003. Clocks on the brain. *Science* 301: 319–320.

[32] Hastings M.H., Walker A.P., Powers J.B. 1989. Differential effects of photoperiodic history on the responses of gonadotrophin and prolactin in intermediate daylenghts in the male Syrian hamster. *J. Biol. Rhytms* 4: 335–350.

[33] Ischiropoulos H., Beers M., Ohnishi T., Fisher D., Garner S., Thom S.R. 1996. Nitric oxide production and privascular tyrosine nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. *J. Clin. Invest*. 97: 1–8.

[34] IUCN (2002). 2002 IUCN red list of threatened animals. IUCN Gland.

[35] Jaczewski Z. 1954. Wpływ oświetlenia dziennego na poroże jelenia *Cervus elaphus*. *Folia Biologica* 2: 133–143.

[36] Jaczewski Z. 1958. Reproduction in the European bison, *Bison bonasus* L., in reserves. *Acta Theriol*. 1: 333–376.

[37] Jaczewski Z., Morstin J., Kossakowski J., Krzywiński A. 1976. Freezing the semen of red deer stags. VIIIth Inter. Cong. on Animal Reprod. and AI, Kraków, 994–997.

[38] Jaczewski Z. 1984. Obserwations on the aggressive and sexual behaviour of red deer (*Cervus elaphus* L.). *Deer* 1: 85–87.

[39] Jaczewski Z. 1987. Hormonalna regulacja behawioru seksualnego i socjalnego jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus* L.) ze szczególnym uwzględnieniem czynników regulujących cykl poroża. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol*. 340: 181–203.

[40] Jaczewski Z. 1992. Poroże jeleniowatych. PWRiL, W-wa.

[41] Jaczewski Z., Korona A. 1994. Bibliografia rodzaju Bison (H. Smith, 1827). PAN, Warszawa.

[42] Jaczewski Z., Giżejewski Z., Bartecki R., Barańczyk-Kuźma A., Barszczewska I. 1996. The effect of the frequency of red deer stag semen collection on its density and glutathione-S-transferase activity. *Anim. Sci. Pap. Rep*. 14(2): 121–130.

[43] Jezierski T.A., Koziorowski M., Goszczyński J., Sieradzka I. 1989. Homosexual and social behaviours of young bulls of different geno- and phenotypes and plasma concentrations of some hormones. *Applied Anim. Behaviour Sci*. 24: 104–113.

[44] Kennaway D.J., Voultsios A., Varcoe T.J., Moyer R.W. 2003. Melatonin and activity rhythm responses to light pulses in mice with the Clock mutation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 284: 1231–1240.

[45] Kharitonov V.G., Sharma V.S., Pilz R.B., Magde D., Koesling D. 1995. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 92: 2568–2571.

[46] Korwin-Kossakowski J., Sumiński E. 1984. Development of gonads and spermatogenesis in hybrids of European bison and domestic cattle. *Acta Theriol.* 29: 413–424.

[47] Kozdrowski R., Dubiel A. 2004. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 80(3–4): 281–289.

[48] Kozdrowski R., Dubiel A., Siemieniuch M. 2006. Preliminary studies on cryopreservation of hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 379–82.

[49] Kozioł K., Gilun P., Jagusztyn B., Koziorowski M. 2005. Steroid receptors in domestic pig and wild boar crossbreed (pig-boar) uterus during the luteal phase in estrous cycle in different seasons of the year. The 4th Sympozium of the Society for Biology of Reproduction. Joint Polish–Japanese Seminar, Kraków, September 22–24: 210.

[50] Koziorowski M., Giżejewski Z., Staszkiewicz J. 1998. Seasonal changes in concentrations of steroid hormones in the semen plasma of red deer stags. 4th International Deer Biology Congress, Kaposvar, June 30–July 4, Hungary, Abs. 59.

[51] Koziorowski M., Seremak B., Giżejewski Z., Gilun P., Kozioł K., Kowal E., Jagusztyn B., Sulik M., Szeleszczuk O., Olech W., Söderquist L., Glogowski J. 2006. Season controlled reproduction of undomesticated animals. *Reprod. Biol.* 6, Suppl. 1: 137–149.

[52] Koziorowski M., Stefańczyk-Krzymowska S., Gilun P., Tabęcka-Łonczyńska A., Kozioł K., Jagusztyn B. 2005. Seasonal changes in steroid hormone concentration during estrous cycle in peripheral blood in gilts of domestic pig and wild boar crossbreed (pig-boar). The 4th Sympozium of the Society for Biology of Reproduction. Joint Polish–Japanese Seminar, Kraków, September 22–24: 221–222.

[53] Krasiński Z., Raczyński J. 1967. The reproduction biology of European bison living in reserves and freedom. *Acta Theriol*. 12: 407–444.

[54] Krasińska M. 1971. Hybridisation of European bison with domestic cattle. Part VI. *Acta Theriol.* 16: 413–422.

[55] Krasińska M. 1988. Hybrydy żubra i bydła domowego. Praca habilitacyjna, Ossolineum.

[56] Krasińska M., Krasiński Z. 1995. Composition, group size, and spatial distribution of European bison bulls in Bialowieza. *Forest. Acta Theriol*. 40: 1–21.

[57] Krasińska M., Krasiński Z. 2004. Żubr. Monografia Przyrodnicza. Warszawa–Białowieża.

[58] Krzywiński A. 1976. Collection of red deer semen with the artificial vagina. Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. AI . Krakow, IV: 1002–1005.

[59] Krzywiński A., Jaczewski Z. 1978. Observations on the artificial breeding of red deer. Symp. Zool. Soc. London. 43:271–287.

[60] Krzywiński A. 1981. Freezing of post mortem collected semen from moose and red deer. *Acta Theriol*. 26(28): 424–426.

[61] Krzywiński A., Wierzchoś E., Smorąg Z. 1984. Observations on recovering and freezing Red deer embryo. *Acta Theriol*. 29(24): 291–295.

[62] Landowski J., Gill J. 1964. Einige Beobachtungen uber das Sperma des Indischen Elefanten (*Elephas maximus* L.). *Der Zoologische Garten* (NF), Bd., 29: 205–212.

[63] Lee T.J.F. 2002. Adrenergic and cholinergic modulation of cerebrovascular nitrergic vasodilation. International Congres Series. 1235: 337–345.

[64] Leffler C.W., Nasjletti A., Yu C., Johnson R.A., Fedinec A.L., Walker N. 1999. Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs. *Am J. Physiol*. 276: H1641–1646.

[65] Lincoln G.A., Andersson H., Hazlerigg D. 2003. Colck genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiodic/circannual timer in the Pars Tuberalis. *J. Neuroendocrinol*. 15: 390–397.

[66] Lincoln G.A., Andersson H., Loudon A. 2003. Clok genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifuing hypothesis. *J. Endocrinol*. 179: 1–13.

[67] Lincoln G.A., Clark I.J. 2002. Noradrenaline and dopamine regulation of prolactin secretion in sheep: role in prolactin homeostasis but not photoperiodism. *J. Neuroendocrinol.* 14: 36–44.

[68] Lincoln G.A., Clark I.J. 1997. Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. *Biol. Reprod*. 57: 460–467.

[69] Malpaux B., Daveau A., Maurice-Mandon F., Duarte G., Chenineau P. 1998. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139: 1508–1516.

[70] Malpaux B., Thiery J-C., Chemineau P. 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Rep. Nutr. Dev*. 39: 355–366.

[71] Matuszewska M., Sysa P.S., Maj K. 1996. Variability of shape and ultrastructure of supporting cell nuclei (Sertoli cells) in the European bison. *Folia Morphol*. (Wa-wa) 55: 390–392.

[72] Matuszewska M., Sysa P.S., Maj K. 1997. Age dependent variability of Sertoli cells nuclei in the European bison (*Bison bonasus*). *Annals of Anatomy*, suppl. 179: 146.

[73] Naik J.S., Walker B.R. 2003. Heme oxygenase-mediated vasodilation involves vascular smooth muscle cell hyperpolarization. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 285: H220–228.

[74] Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J.M., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R. 2006. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *The Federation of European Biochemicals Societies Journal* 273: 2813–2838.

[75] Pielowski Z. 1984. Sarna. PWRiL, W-wa.

[76] Sakurai H., Adams T.E. 1998. The effect of season and melatonin on GnRh-induced Lh secretion in oestradiol-treated orchidectomized sheep. *J. Endocrinol.* 158: 277–283.

[77] Sammut I.A., Forest R., Clark D.J., Vesely M.J., Sarathchandra P., Green C., Motterlini R. 1998. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br. J. Pharmacol*. 125: 1437–1444.
[78] Sempere A.J., Blanvillain C., Mauget R., Lacroix A., Chemineau P. 1995. Effects of melatonin or artificial long days on seasonal ovulatory activity in roe deer (*Capreolus capreolus* L.). *Anim. Reprod. Sci*. 38: 127–136.
[79] Simonneaux V., Ribelayga C. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides and other pineal transmitters. *Pharm. Rev.* 55: 325–395.
[80] Strzeżek J., Krzywiński A., Świdowicz K. 1985. Seasonal changes in the chemical compositioon of red deer (*Cervus elaphus*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 9: 197–204.
[81] Strzeżek J., Giżejewski Z., Wysocki P., Fraser L. 1998. Biochemical characteristics of red deer stag semen. Proc. of the Int. Conference on Reprod. of Farm Anim., Liptovsky Jan Slovak Rep.: 147–150.
[82] Strzeżek J., Bryl K., Giżejewski Z. 1999. The „yellow" fraction of red deer stag ejaculate is a main source of flavin substances and antioxidant factors – seasonal changes. 3rd Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. Le Lion Angers, France: 86–87.
[83] Sumiński E. 1987. Żubronie. Prace wykonane na terenie Jezior Wielkich (PGR Łękno) woj. poznańskie. *Przegl. Hod*. 5: 18–21.
[84] Thorup C., Jones C.L., Gross S.S., Moore L.C., Goligorsky M.S. 1999. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am. J. Physiol.: Renal Physiol*. 277: 882–889.
[85] Whitehead G.K. 1993. The Whitehead Encyclopedia of Deer. Swan Hill Press, Shrewsbury, UK.
[86] Williams L.M., Hannah L.T., Kyle C.E., Adam C.L. 1996. Central melatonin receptors in red deer. *Gen. Comp. Endocrinol*. 104: 1–6.
[87] Wróblewski K. 1927. Żubr Puszczy Białowieskiej. Wydawnictwo Polskie. Poznań: 1–232.
[88] Zakhary R., Gaine S.P., Dinerman J.L., Ruat M., Flavahan N.A., Snyder S.H. 1996. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 795–798.
[89] Żurowski W. 1977. Rozmnażanie się bobrów europejskich w warunkach fermowych. PAN, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Rozprawy habilitacyjne, nr 7.

Reproduction of undomesticated animals – the successes of Polish science and its perspectives as compared with the world research results

Key words: reproduction, undomesticated animals, seasonality

Summary

Only a small group of researchers have been involved in the studies on reproduction of undomesticated animals in Poland. Most of papers published so far pertain to the reproduction of deer at large. The main achievements of Polish scientists in this area were: working out the methods of semen collection and conservation, successful artificial insemination as well as the evaluation of seasonal changes in semen qualitative and quantitative traits. Presently, there are in progress the studies on biology of European bison, European beaver and hare semen as well as an implementation of bison and deer semen cryoconservation into practice. Developing biotechnological methods of cryoconservation of wildlife semen may be of special significance for protecting biodiversity of species, especially the endangered ones. Further research on the control of reproduction variability in different seasons might play great cognitive and practical role, especially for solution of seasonal infertility problems in some domesticated breeds and undomesticated species.