

Budowa, właściwości i rola osłonki przejrzystej komórki jajowej ssaka

GABRIELA KANIA

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa

Kania G.

The structure, properties and function of the zona pellucida of mammalian ovums

Summary

The zona pellucida is a relatively thick, glycoprotein coat surrounding mammalian eggs. It is formed during follicular development and continues to enclose the early embryo until implantation. It consists of 3 main glycoproteins called ZP1, ZP2, ZP3. There is considerable *in vitro* data that ZP3 and ZP2 act as sperm adhesion molecules in mice and by analogy a similar role has been postulated for golden hamster, pig and human glycoproteins.

In some mammals (mouse, golden hamster, pig and opossum) secretion of oviducts have been shown to bind to the surface of postovulatory eggs. This is due to the ZP0 glycoprotein present in the zona pellucida of oviductal eggs.

A cortical reaction takes place after fertilization or partenogenetic activation of the oocyte. Cortical granules undergo exocytosis as a result of an increase in the level of calcium. The content of the cortical granules that is released into the perivitelline space modifies the zona pellucida glycoproteins which results in the hardening of the zona pellucida. In bovine oocytes this may occur after direct contact with the internal environment of the homo- or heterological oviduct. This process manifests itself as an increased resistance of the zona pellucida to the action of various proteases and chemical reagents. Hardening of the zona pellucida decreases cleavage and blastocyst development as well. The article presents the three main functions of the zona pellucida: 1) the recognition of species-specificity in sperm-egg interaction, 2) the prevention of polyspermy after fertilization, 3) the protection of the developing embryo prior to implantation.

Keywords: oocyte, zona pellucida, structure, hardening.

Oślonka przejrzysta jest sztywną, galaretowatą, bezkomórkową warstwą otaczającą oocyt, która odgranicza go od komórek wieńca promienistego. Przenikają przez nią, w kierunku oocytu, cienkie kanaliki, w których przebiegają wypustki wieńca promienistego. Formowanie osłonki rozpoczyna się we wczesnym pęcherzyku przedantralnym, tj. takim, w którym oocyt otoczony jest dwiema warstwami komórek ziarnistych. Początkowy etap formowania osłonki przejrzystej polega na odkładaniu się jej w formie kłaczek, a w miarę wzrostu oocytu osłonka staje się warstwą ciągłą, o coraz większej gęstości i stopniu polimeryzacji składników (20).

Oślonka przejrzysta stanowi dość gruby, glikoproteinowy płaszcz otaczający oocyt ssaka. Za pomocą metod histochemicznych wykazano obecność kwasnych i obojętnych mukopolisacharydów, o rozmieszczeniu zróżnicowanym gatunkowo. Na podstawie analizy biochemicznej ustalono, że są to usiarczanowane glikoproteiny z resztami kwasu siałowego. Pionierskie badania nad budową osłonki przejrzystej oocytu my-

szy opublikowali w 1980 r. Bleil i Wassarman (cyt. 8). Wyizolowali oni z osłonki 3 główne glikoproteiny, które zostały oznaczone jako: ZP1, ZP2 i ZP3, o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio: 180-200 kDa, 120-140 kDa i 83 kDa. Obecność analogicznych glikoprotein stwierdzono w osłonkach przejrzystych innych gatunków ssaków, nie wyłączając człowieka. Pojawiające się różnice międzygatunkowe dotyczą zmian w ilości i rozmieszczeniu występujących w nich aminokwasów (33). Oślonka przejrzysta oocytu myszy zawiera długie, połączone ze sobą filamenty, każdy o grubości 7 nm. Podstawę struktury stanowią filamenty zbudowane z glikoprotein ZP2 i ZP3, które tworzą dimery. Taki dimer jest powtórzony setki razy w każdym filamencie. Filamenty osłonki są połączone ze sobą glikoproteinami ZP1, zbudowanymi z dwóch identycznych łańcuchów polipetydowych, zespolonych poprzez wiązania dwusiarczkowe. Powstaje wówczas trójwarstwowa struktura, co prowadzi do rozmieszczenia milionów cząsteczek glikoproteiny ZP3 na powierzchni osłonki przejrzystej (44). Taka

pokażna liczba cząsteczek ZP3 nie wydaje się zaskakująca, jeśli zważyć na rolę tej glikoproteiny. Stanowi ona bowiem nie tylko element strukturalny i szkieletowy osłonki, lecz jest również receptorem dla plemnika w czasie zapłodnienia. Łańcuch polipeptydowy glikoproteiny ZP3 zbudowany jest z ok. 400 aminokwasów. Zawiera liczne, krótkie odgałęzienia łańcuchów oligosacharydowych, złożonych z cukrów prostych (44).

Ostatnio opublikowane badania (35) wskazują, że glikoproteiny osłonki przejrzystej oocytów mysich i ludzkich są białkami konserwatywnymi. Białka takie cechuje niezmiennosc budowy strukturalnej, zachowana w toku ewolucji. Za najbardziej konserwatywną glikoproteinę uważa się ZP3, której łańcuch złożony jest z 424 aminokwasów, spośród których aż 67% jest identycznych w porównaniu z ludzkimi. Mysia i ludzka glikoproteina ZP2 zawiera odpowiednio 713 i 745 aminokwasów, z których 61% jest identycznych. Mysia i ludzka glikoproteina ZP1 zbudowana jest odpowiednio z 623 i 540 aminokwasów; analiza porównawcza wykazała, że 43% z nich jest identycznych, a 83 dodatkowe aminokwasy, występujące w mysiej ZP1, są podobne do aminokwasów budujących glikoproteinę ludzką. Masy cząsteczkowe ludzkich glikoprotein: ZP1, ZP2 i ZP3 nieznacznie różnią się od mysich i wynoszą kolejno: 90-110 kDa, 64-78 kDa i 57-73 kDa (35, 36).

Biochemiczne i immunologiczne właściwości osłonki przejrzystej oocytów myszy, chomików i świni zmieniają się po owulacji (23, 31). Zmienność immunologiczna osłonki wiąże się z różnym rozmieszczeniem na jej powierzchni lektyn (29) i komponentów wiążących przeciwciała (2). Dane te sugerują, że struktura osłonki przejrzystej jest asymetryczna. Obserwacje przy użyciu mikroskopu skaningowego wykazały, że powierzchnia osłonki przejrzystej wielu gatunków ssaków (np. szczurów, myszy, królików i psów) wykazuje obecność nieregularnych warstw zwartego materiału, zawierającego granule i filamenty. Taka nieregularność budowy powierzchni osłonki przejrzystej pozwala na wytworzenie pofałdowanej struktury z licznymi, wąskimi „kryptami” i mikrokanalikami, przypominającymi sieć. Porowatą strukturę powierzchni osłonki przejrzystej obserwowano również w hodowanych *in vitro* oocytach ludzkich. Jednak tylko część z nich posiada taką strukturę osłonki, pozostałe charakteryzują się gładką powierzchnią. Na podstawie dalszych obserwacji wysnuto wniosek, iż oocyty przedowulacyjne posiadają gładką powierzchnię osłonki, natomiast oocyty poowulacyjne – pofałdowaną (18). Próbowano więc rozstrzygnąć, czy istnieje różnica w budowie osłonki przejrzystej oocytów niedojrzałych, pęcherzykowych i dojrzałych, poowulacyjnych, mających bezpośredni kontakt ze środowiskiem jajowodu.

Osłonkę przejrzystą niedojrzałego oocytu chomika pochodzącego z pęcherzyka jajnikowego nazwano ZP-

-OVA (zona pellucida of ovarian origin). Zbudowana jest ona podobnie jak osłonka oocytu myszy, tzn. zawiera dwie warstwy, których masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio: 110-170 kDa i 55-70 kDa. Stwierdzono, że warstwa o większej masie cząsteczkowej zawiera dwie glikoproteiny: ZP1 i ZP2, a warstwa o masie 55-70 kDa – glikoproteinę ZP3 (31).

Natomiast osłonka przejrzysta poowulacyjnego oocytu chomika określana jest jako: ZP-OVI (zona pellucida of oviductal origin). W jej skład wchodzi, podobnie jak w ZP-OVA, warstwy: 110-170 kDa (zawierająca glikoproteiny ZP1 i ZP2) i 55-70 kDa (zawierająca glikoproteinę ZP3). Dodatkowo występuje jeszcze glikoproteina ZP0 (160-250 kDa), charakterystyczna tylko dla ZP-OVI. Glikoproteina ZP0 jest syntetyzowana i wydzielana przez jajowodowe komórki wydzielnicze. Cząsteczka ta asocjuje z osłonką przejrzystą poowulacyjnych oocytów chomika (1, 31). Rozmieszczenie glikoproteiny ZP0, przynajmniej u chomika, jest asymetryczne (1). Trawienie hialuronidazą oocytów chomiczych otoczonych komórkami wzgórką jajonośnego powoduje zmniejszenie ilości glikoproteiny ZP0 w najbardziej zewnętrznej warstwie osłonki przejrzystej. Na podstawie badań histochemicznych (40) i ultrastrukturalnych (41) komórek jajowych chomika stwierdzono, że w najbardziej zewnętrznej warstwie osłonki przejrzystej jest obecny kwas hialuronowy, będący substratem dla hialuronidazy nasienia. Wykazano, że to właśnie hialuronidaza jest odpowiedzialna za zmiany morfologiczne regionu glikoproteiny ZP0. Na podstawie badań immunofluorescencyjnych (1) wykazano ultrastrukturalną asocjację glikoproteiny ZP0 z materiałem okołożółtkowym. Obserwacje prowadzone na myszach, chomikach, oposach i świniach również potwierdzają fakt, że glikoproteina ZP0 jest jednym z komponentów ściśle związanych z mikrośrodowiskiem obszaru okołożółtkowego. W przestrzeni okołożółtkowej owulowanych jaj chomiczych wykazano obecność nieprzejrzystej macierzy. Ultrastrukturalną budowę okołożółtkowej macierzy opisano również u myszy (1), oposa (43) i świni (42). Obraz okołożółtkowej macierzy oocytów mysich różni się od macierzy oocytu chomika tym, iż zawiera siateczkowate elementy. Pomimo, że natura okołożółtkowych komponentów nie została zdefiniowana, to ich obecność odpowiada za wytworzenie specyficznego mikrośrodowiska dla zapłodnienia i rozwoju zarodka (1). U chomików przestrzeń okołożółtkowa ekspanduje po owulacji (48). Zmiana ta wiąże się z akumulacją materiału pochodzącego z płynu jajowodowego i z ziaren korowych (30). Abe i Oikawa (1) wnioskuje, że asocjacja jajowodowej glikoproteiny z materiałem okołożółtkowym jest odpowiedzialna, przynajmniej w ostatniej fazie, za ekspansję przestrzeni okołożółtkowej. Prawdopodobną funkcją glikoproteiny ZP0 może być zmiana strukturalnych i bio-

logicznych właściwości osłonki przejrzystej. Integracja jajowodowej glikoproteiny z osłonką przejrzystą owulowanego jaja może być uniwersalnym zjawiskiem (30).

Podobnie jak u chomika, zaobserwowano różnice w składzie glikoprotein osłonki przejrzystej oocytu świni pochodzącego z pęcherzyka jajnikowego i oocytu poowulacyjnego, pobranego z jajowodu (9). Osłonka przejrzysta oocytu przedowulacyjnego zawiera glikoproteiny o masie 250 kDa oraz 90 kDa. Yurewicz i wsp. (49) zaproponowali dla glikoprotein osłonki przejrzystej niedojrzałego oocytu oznaczenia ZP-B i ZP-C. Częsteczki te uważa się za homologi glikoprotein ZP2 i ZP3 u myszy. Wyizolowana glikoproteina ZP-B wykazuje duże powinowactwo do glikoprotein błony plemnika, w przeciwieństwie do glikoproteiny ZP-C. To sugeruje, że glikoproteina ZP-B może być potencjalnym receptorem dla plemników knura. Natomiast osłonka poowulacyjnego oocytu świni zbudowana jest z glikoprotein o masie cząsteczkowej: 90, 79 i 69 kDa. Brown i Cheng (9) uważają, że cząsteczki glikoprotein obecne w płynie jajowodowym przedostając się przez komórki wzgórką jajonośnego i wieńca promienistego, stykają się z osłonką przejrzystą wcześniej niż plemnik, przez co powodują zmianę strukturalnych i biologicznych właściwości osłonki.

Jak już wcześniej wspomniano, glikoproteiny ZP2 i ZP3 osłonki przejrzystej stanowią receptory dla zapładniającego ocyt plemnika. By doszło do adhezji plemnika do osłonki przejrzystej i w konsekwencji do zapłodnienia, plemnik musi przejść proces kapacytacji, prowadzący do odsłonięcia miejsc receptorowych na główce plemnika, co pozwala na połączenie z osłonką przejrzystą (22). Umożliwiają tę penetrację enzymy zawarte w akrosomie plemnika, tj. hialuronidaza, β -N-acetyloheksosaminidaza, akrozyna, neuraminidaza, fosfolipazy, uwalniane podczas reakcji akrosomalnej. Przyjmuje się, że hialuronidaza i β -N-acetyloheksosaminidaza osłabiają połączenia komórkowe, ułatwiając plemnikowi przejście przez komórki wzgórką jajonośnego, a akrozyna, neuraminidaza i fosfolipazy biorą udział w penetracji osłonki przejrzystej oocytu (4).

Osłonka przejrzysta niedojrzałych oocytów szeregu gatunków ssaków, tj. myszy, chomików, królików, owiec i świń, posiada zdolność łączenia się z kapacytowanymi plemnikami. Adhezja plemnika do osłonki niedojrzałego oocytu nie prowadzi jednak do prawidłowego procesu zapłodnienia. Stwierdzono bowiem, że niedojrzałe oocyty nie są zdolne do reakcji egzocytozy ziaren korowych i wytworzenia bloku przeciw polispermii (13).

Przedstawione powyżej zmiany budowy osłonki przejrzystej znajdują odzwierciedlenie w jej właściwościach fizjologicznych. Za najważniejszą zmianę uznać należy zjawisko twardnienia osłonki przejrzystej. Zjawisko to, przejawiające się wzrostem odpor-

ności na trawienie enzymatyczne, zachodzi w wyniku procesów utleniania tyrozyny po uwolnieniu z ziaren korowych owoperoksydazy (39). Nowsze badania (12) wykazały, że proces egzocytozy ziaren korowych, zlokalizowanych w bezpośrednim sąsiedztwie plazmolemmy oocytu, rozpoczyna się w odpowiedzi na stymulację trójinozotofosforanu IP_3 . Aktywacja tego wtórnego przekaźnika sygnału wewnątrzkomórkowego następuje w wyniku wzrostu poziomu jonów wapnia, następującego w czasie zapłodnienia lub partenogenetycznej aktywacji jaja (12). W czasie reakcji egzocytozy zostają wydzielone do przestrzeni okołoołtkowej enzymy, m.in. glikozydaza i proteinaza ZP2, które modyfikują glikoproteiny osłonki. Uważa się, że glikozydaza modyfikuje glikoproteinę ZP3, w konsekwencji czego traci ona właściwości receptorowe dla plemników. Natomiast proteinaza ZP2 powoduje modyfikację glikoproteiny ZP2, czego następstwem jest twardnienie osłonki przejrzystej oraz utrata właściwości receptorowych. Nie dochodzi wówczas do penetracji osłonki przejrzystej przez plemniki (45). Opisane zmiany w strukturze i właściwościach osłonki przejrzystej są odpowiedzialne za wytworzenie tzw. bloku przeciw polispermii, stanowiącego barierę zabezpieczającą ocyt przed penetracją kolejnych plemników.

Już w połowie lat 50-tych Chang i Hunt (cyt. 21) wykazali, że osłonka przejrzysta komórki jajowej myszy, królika i świni po zapłodnieniu wykazuje większą odporność na trawienie enzymatyczne, w porównaniu z oocytami przedowulacyjnymi i świeżo owulowanymi. Kolejne badania dowiodły, że istnieje możliwość spontanicznego twardnienia osłonki przejrzystej np. w wyniku przetrzymywania lub hodowli *in vitro* oocytów myszy i kłaczy (15, 17). Proces twardnienia osłonki przejrzystej myszy zachodzi tylko w przypadku, gdy oocyty pozbawione są komórek wzgórką jajonośnego i wieńca promienistego (20, 38). Zjawisku temu można zapobiec poprzez dodanie do pożywki surowicy (17) lub glikozoaminoglikanów (14). Fuscoc i wsp. (19) przypuszczają, że spontaniczne twardnienie osłonki oocytów końskich jest główną przyczyną ich obniżonej zdolności do zapłodnienia *in vitro*. Zjawiska spontanicznego twardnienia osłonki nie obserwowano natomiast w inkubowanych *in vitro* oocytach bydlęcych (26). Badania właściwości osłonki przejrzystej oocytów bydlęcych wykazały, że główną przyczyną twardnienia osłonki przejrzystej jest jej bezpośredni kontakt ze środowiskiem jajowodu, gdyż zjawisko to obserwowano nie tylko w przypadku niezapłodnionych oocytów poowulacyjnych, lecz również w oocytach niedojrzałych lub przedowulacyjnych przetrzymywanych w jajowodach homologicznych lub heterologicznych. Proces twardnienia osłonki rozpoczął się już po kilku minutach kontaktu osłonki ze środowiskiem jajowodu i narastał w miarę upływu czasu inkubacji (25).

Stwierdzono, że twardnienie osłonki przejrzystej wpływa negatywnie zarówno na zapłodnialność oocytów jak i na rozwój zarodkowy (26). Oceniając zdolność do zapłodnienia i rozwoju zarodkowego oocytów bydłowych poddanych przed zapłodnieniem inkubacji w jajowodach stwierdzono, iż zależy ona od stopnia twardości osłonki przejrzystej. Obserwowano odwrotnie proporcjonalną zależność między twardością osłonki a liczbą uzyskanych zygot (24, 26). W konsekwencji obniżonej zdolności do zapłodnienia takich oocytów stwierdzono znaczną redukcję liczby otrzymanych blastocyst, tym większą, im osłonka przejrzysta była bardziej odporna na proteolizę.

Można zakładać, że twardnienie osłonki przejrzystej oocytów ssaków prowadzi do występowania różnic w otrzymanym stosunku płci zarodków. Wiadomo bowiem, że w warunkach *in vivo*, tuż po owulacji, oocyty są częściej penetrowane przez plemniki męskie, które poruszają się szybciej niż żeńskie. Natomiast w oocytach poowulacyjnych, które przebywają w środowisku jajowodu, zapoczątkowany zostaje proces twardnienia osłonki przejrzystej, co umożliwia jej penetrację, a w konsekwencji zapłodnienie oocytu, tylko przez silniejsze plemniki żeńskie. Na podstawie wstępnych obserwacji analizy płci zarodków, uzyskanych w wyniku zapłodnienia dojrzałych *in vitro* oocytów bydłowych, w których eksperymentalnie wywołano twardnienie osłonki przejrzystej, zauważono rysującą się tendencję do zmiany rozkładu płci (przewaga blastocyst płci żeńskiej). Natomiast analiza płci zarodków otrzymanych w wyniku zapłodnienia dojrzewających *in vitro* oocytów o nie stwardniałej osłonce przejrzystej wykazała zmianę w otrzymanym stosunku płci w kierunku zarodków męskich (3, 10, 16, 46). Możliwość regulacji płci zarodka poprzez zapłodnienie *in vitro* oocytów o zmodyfikowanych właściwościach osłonki przejrzystej z praktycznego punktu widzenia wydaje się być interesującym rozwiązaniem.

Omówiliśmy już funkcję osłonki podczas kapacytacji plemników i penetracji komórki jajowej. Należy jeszcze wspomnieć o roli jaką pełni osłonka przejrzysta w zarodku od stadium 1-komórkowego do momentu wylęgania się blastocysty. Stanowi ona naturalną osłonę, zabezpieczającą zarodek w czasie wędrówki przez drogi rodne samicy, a twardnienie osłonki potęguje jej zdolności ochronne. Ponadto osłonka przejrzysta w zarodku stanowi barierę sanitarną dla wirusów. Ten aspekt ochronnej roli osłonki jest szczególnie istotny przy transplantacjach zarodków. Zastosowanie transplantacji zarodków pozwala na międzynarodową wymianę materiału genetycznego, co może stanowić potencjalne zagrożenie roznoszenia chorób zakaźnych. Szereg wirusów ma zdolność wiązania się z osłonką przejrzystą zarodka, np.: wirus zakaźnej ospy bydłowej BHV-4, otrętu (IBRV), wirus pomoru (RPV). Rozprzestrzenianiu tych wirusów, w wyniku transplantacji opłaszczonych nimi zarodków, można zapobiec stosując wielokrotne płukanie zarodków w roztworze trypsyny (6).

Modliński (28) oraz Bronson i McLaren (7) wykazali, że zarodki wczesnych stadiów rozwojowych, tj. przed kompakcją, pozbawione osłonki przejrzystej, nie są w stanie prawidłowo rozwijać się w jajowodzie samicy biorczyni, bowiem skurcze mięśniówki jajowodu oddziałując na połączenia między blastomerami, prowadzą do rozpadu zarodka na pojedyncze komórki. Z tych też powodów w zapoczątkowanych w latach 80-tych pracach z zakresu bisekcji zarodków, uzyskane „połówki” umieszczano w zastępczych osłonkach przejrzystych przed ich przeniesieniem do jajowodu samicy biorczyni (32). Okazało się jednak, że takie postępowanie nie jest konieczne, gdy bisekcji poddawane są zarodki w stadium blastocysty. Natomiast zarodki wcześniejszych stadiów rozwojowych poddane bisekcji, aby mogły prawidłowo rozwijać się w drogach rodnych samicy biorczyni, wymagają obecności zastępczej osłonki przejrzystej (11, 47).

Osłonka przejrzysta spełnia również rolę ochronną w czasie procesu kriokonserwacji zarodków. W tym przypadku, podobnie jak podczas przeprowadzania bisekcji, istotną rolę odgrywa wiek zarodka, tj. osiągnięte stadium rozwoju. Wykazano, że mysie zarodki wczesnych stadiów rozwojowych, zamrażane bez osłonki przejrzystej, ulegają rozpadowi na pojedyncze blastomery. Natomiast mysie zarodki w stadium moruli i blastocysty, zamrażane bez osłonki przejrzystej, wykazywały po rozmrożeniu podobne zdolności rozwojowe jak zarodki zamrażane w osłonce (37). Z kolei zarodki bydłowe, niezależnie od stadium rozwoju, których osłonka nie uległa uszkodzeniu w procesie kriokonserwacji, wykazywały wyższe zdolności rozwojowe, w porównaniu z zarodkami o uszkodzonych osłonkach (34).

Twardnienie osłonki jest skorelowane z jej grubością i w miarę rozwoju zarodka, czyli jego wędrówki przez drogi rodne samicy, zwiększa się wrażliwość osłonki na trawienie proteolityczne, a tym samym zmniejsza się jej grubość (27).

Podsumowując, obecność osłonki przejrzystej oocytu ssaka, będącej integralnym elementem komórki jajowej, jest odpowiedzialna za prawidłową, gatunkowo zależną, adhezję plemnika do osłonki. Widać tu receptorową rolę osłonki. W wyniku zapłodnienia, partenogenetycznej aktywacji jaja lub też bezpośredniego kontaktu ze środowiskiem jajowodu następuje proces twardnienia osłonki przejrzystej. Z kolei ten proces zabezpiecza oocyt przed penetracją kolejnych plemników, czyli przed powstaniem polispermii. Ponadto osłonka ochrania rozwijający się zarodek aż do momentu jej opuszczenia, określanego jako wylęganie się blastocysty. Powstaje pytanie czy zmiana właściwości osłonki przejrzystej określana jako twardnienie, może wpłynąć na zróżnicowanie stosunku płci zarodków? Zagadnienie to jest na tyle intrygujące i interesujące, iż powinno mu się poświęcić nieco więcej uwagi w toku realizacji kolejnych doświadczeń.

Piśmiennictwo

1. Abe H., Oikawa T.: J. Exp. Zool. 256, 210, 1990.
2. Ahuja K. K., Bolwel G. P.: J. Reprod. Fert. 61, 257, 1983.
3. Avery B., Madison V., Greve T.: Theriogenology 35, 953, 1991.
4. Barnes F. L., Eyestone W. H.: Theriogenology 33, 141, 1990.
5. Bielański A., Eaglesome M. D., Ruhnke H. L., Hare W. C. D.: J. in Vitro Fert. 6, 236, 1989.
6. Bielański A., Tischner M.: Przepisy sanitarne i wyniki badań, W: Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich, „Universitas”, 1993, s. 56.
7. Bronson R. A., McLaren A.: J. Reprod. Fert. 22, 129, 1970.
8. Brown C. R.: J. Reprod. Fert. 77, 411, 1986.
9. Brown C. R., Cheng K. T.: J. Embryol. Exp. Morph. 92, 183, 1986.
10. Carvalho R. V., Del Campo M. R., Palasz A. T., Plante Y., Mapletoft R. J.: Theriogenology 45, 489, 1996.
11. Chesne P., Colas G., Cognie Y., Guerin Y., Sevelles C.: Theriogenology 27, 751, 1987.
12. Connors S. A., Kanatsy-Shinohara M., Schultz R. M., Kopf G. S.: Dev. Biol. 200, 103, 1998.
13. Crozet N., Dumont M.: Gamete Res. 10, 97, 1984.
14. De Felici M., Siracusa G.: Gamete Res. 6, 107, 1982.
15. Dell'Aquila M. E., De Felici M., Maritato F., Lacalandra G., Minoia P.: Proc. Symp. A.E.T.E., Venice, 1998, s. 140.
16. Dominko T., First N. L.: Biol. Reprod. 48, 439 (abstr.), 1993.
17. Downs S. M., Schroeder A. C., Eppig J. J.: Gamete Res. 15, 115, 1986.
18. Familiari G., Nottola S. A., Micara G., Aragona C., Motta P. M.: J. in Vitro Fert. 5, 134, 1988.
19. Fuscoc S., Dell'Aquila M. E., De Felici M., Lacalandra G. M., Minoia P.: Proc. Symp. A.E.T.E., Venice, 1998, s. 158.
20. Gianfortoni J. G., Gulyas B. J.: Gamete Res. 11, 59, 1985.
21. Gould K., Zanaveld J. D., Strivastava P. N., Williams W. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. 136, 6, 1971.
22. Gwatkin R. B. L., Williams D. T.: Gamete Res. 1, 259, 1978.
23. Hedrick J. L., Wardrip N. J.: Biol. Reprod. 35, 677, 1987.
24. Kania G., Kątska L.: Anim. Sci. Papers 16, Suppl. 1, 55 (abstr.), 1998.
25. Kątska L., Smorąg Z., Gajda B.: 11th Congr. Anim. Reprod., Dublin 3, 334, 1988.
26. Kątska L., Kauffold P., Smorąg Z., Duschinski U., Torner H., Kanitz W.: Theriogenology 32, 767, 1989.
27. Menino A. R., Wright R. W.: J. Anim. Sci. 55, 369, 1982.
28. Modliński J. A.: J. Embryol. Exp. Morph. 23, 539, 1970.
29. Nicolson G. L., Yanagimachi R., Yanagimachi H.: J. Cell Biol. 66, 263, 1975.
30. Oikawa T., Kurata S., Sendai Y.: J. Reprod. Immunol. (Suppl.) 81, 1986.
31. Oikawa T., Sendai Y., Kurata S., Yanagimachi R.: Gamete Res. 19, 113, 1988.
32. Ozil J. P.: J. Reprod. Fert. 69, 463, 1983.
33. Pavlok A.: Folia Biol. (Praha) 26, 188, 1980.
34. Picard L., Schneider U., Betteridge K. J., King W. A.: J. in Vitro Fert. 5, 268, 1988.
35. Rankin T. L., Tong Z. B., Castle P. E., Lee E., Gore-Langton R., Nelson L. M.: Development 126, 2415, 1998.
36. Sacco A. G., Yurewicz E. C., Subramanian M. G., DeMayo F.: Biol. Reprod. 25, 997, 1981.
37. Smorąg Z.: Warunki zamrażania zarodków przy użyciu DMSO jako czynnika osłaniającego. Praca dokt., Instytut Zootechniki, Kraków, 1977.
38. Smorąg Z., Kątska L.: Theriogenology 30, 13, 1988.
39. Szöllosi D.: Mammalian eggs in the fallopian tubes. W: Aging Gametes, (wyd.) R. J. Blandau, Karger A. G., Basel, 1975, s. 98.
40. Tadano T., Yamada K.: Histochemistry 57, 200, 1978.
41. Talbot P.: J. Exp. Zool. 229, 309, 1984.
42. Talbot P., DiCarlantonio P.: Gamete Res. 10, 127, 1984a.
43. Talbot P., DiCarlantonio P.: Dev. Biol. 103, 159, 1984b.
44. Vanderhyden B. C., Laughlin M. C., Rutledge J. M., Armstrong D. T.: Biol. Reprod. 40, 953, 1989.
45. Wassarman P. M.: Development 108, 1, 1990.
46. Wayda E., Plucienniczak G., Jura J., Plucienniczak A., Kątska L., Skrzyżowska M., Smorąg Z.: Medycyna Wet. 51, 530, 1995.
47. Williams T. J., Elsdon R. P., Seidel G. E.: Theriogenology 22, 521, 1984.
48. Yang C. H., Yanagimachi R.: Human Reprod. 4, 63, 1989.
49. Yurewicz E. C., Sacco A. G., Gupta S. K., Xu N. X., Gage D. A.: J. Biol. Chem. 273, 7488 (abstr.), 1998.

Adres autora: mgr Gabriela Kania, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa



ORGANON TEKNIKA

Firma ORGANON TEKNIKA

oferuje

immunoenzymatyczne testy
do wykrywania w żywności antygenów

- ✘ SALMONELLA spp.
- ✘ LISTERIA spp.
- ✘ E. COLI O157:H7

oferujemy także

skomputeryzowaną aparaturę umożliwiającą

- ✓ wykonywanie testów
oraz
- ✓ gromadzenie i analizę wyników

ORGANON TEKNIKA
Oddział w Warszawie
ul. Kubickiego 3 m. 2
02-954 Warszawa
tel. 0-22 642 00 26/27
fax 0-22 642 45 05