

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JAN GLOGOWSKI, JERZY STRZEŻEK

Fosfataza alkaliczna — niektóre właściwości i funkcja w żeńskim i męskim układzie rozrodczym

Z Zakładu Biochemii Zwierząt Instytutu Fizjologii i Biochemii Zwierząt AR-T w Olsztynie

Fosfataza alkaliczna (EC 3.1.3.1: fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych) należy do enzymów obecnych prawie we wszystkich komórkach poszczególnych narządów, w tym również w układzie rozrodczym. Istnieje jednak wyraźne zróżnicowanie tkankowe z uwagi na aktywność tego enzymu. Najwyższą aktywność fosfatazy alkalicznej stwierdzono w błonie śluzowej jelita cienkiego, łożyska i gruczołe mlekowym, nieco niższą w tkankach: nerkowej, kostnej, płucnej, wątrobowej oraz śledzionie. Najniższa aktywność enzymu charakteryzuje ścięgna i tkankę łączną (26).

Fosfatazę alkaliczną, częściowo lub całkowicie oczyszczoną, izolowano między innymi z surowicy krwi człowieka (4), łożyska kobiet (25), jelita cienkiego szczura, myszy i konia, oraz dwunastnicy kury (9, 13, 16, 34, 45), wątroby konia (9), mleka krowy (32) a także nerki świni i bydła (1, 2, 11, 54). Uzyskane wyniki badań odnośnie ich właściwości fizykochemicznych i biochemicznych wskazują na heterogenną budowę fosfatazy alkalicznej. Heterogenność ta uwarunkowana jest głównie różnym poziomem związanego z białkiem kwasu sjałowego. Kwas sjałowy wywiera decydujący wpływ na ładunek elektrostatyczny enzymu a tym samym na zróżnicowaną ruchliwość elektroforetyczną poszczególnych form molekularnych (3, 26, 29, 46, 53).

Fosfataza alkaliczna aktywowana jest głównie jonami magnezu (2, 3, 15, 27, 37, 53) oraz innymi dwuwartościowymi kationami jak Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} . Aktywujący efekt poszczególnych jonów uwarunkowany jest tkankowym źródłem enzymu (11, 12, 28). Swoistym niekompetycyjnym inhibitorem fosfatazy alkalicznej jest L-fenylalanina. Inhibitor ten w różnym stopniu hamuje aktywność enzymu, w zależności od jego pochodzenia tkankowego. Wrażliwość na L-fenylalaninę poszczególnych fosfataz tkankowych ma duże znaczenie w badaniach klinicznych i diagnostycznych.

Mimo wielu wspólnych cech biochemicznych fosfatazy alkalicznej z poszczególnych tkanek wykazuje ona również swoiste właściwości, obejmujące między innymi: ruchliwość elektroforetyczną, wrażliwość na temperaturę, działanie

neuraminidazy, wpływ aktywatorów i inhibitorów, budowę części białkowej oraz zawartość kwasu sjałowego i optima pH.

Tkanki wydzielnicze i płyny żeńskiego i męskiego układu rozrodczego charakteryzuje wysoka aktywność fosfatazy alkalicznej. Stosunkowo dobrze znane są właściwości biochemiczne fosfatazy łożyska i macicy (3, 17, 44, 52, 55).

Fosfataza łożyskowa, podobnie jak izoenzymy wątrobowe oraz nerkowy i kostny, należy do sjałoprotein. Różni się od nich większą termostabilnością oraz opornością na działanie mocznika. Nawet 8 M stężenie mocznika nie powoduje spadku aktywności enzymu. Jest to zapewne adaptacyjnie uwarunkowana właściwość, zabezpieczająca działanie fosfatazy alkalicznej w środowisku o wysokim stężeniu mocznika w wodach płodowych a zwłaszcza w płynie omoczniowym. Podstawową funkcją fosfatazy łożyskowej, wydaje się, jest jej udział w transporcie składników pokarmowych, w tym głównie cukrów, poprzez łożysko z krwi matki do płodu. Oznaczanie aktywności izoenzymu łożyskowego w surowicy krwi ma duże znaczenie diagnostyczne. W surowicy krwi kobiet ciężarnych izoenzym łożyskowy pojawia się od drugiego miesiąca ciąży. Aktywność tego izoenzymu wzrasta systematycznie wraz z rozwojem płodu (3). Brak tych prawidłowości w zmianach aktywności wskazuje na patologię ciąży (44, 52). Po porodzie aktywność izoenzymu łożyskowego w surowicy krwi gwałtownie spada i zanika. Fosfataza łożyskowa jest w znacznym stopniu hamowana przez L-fenylalaninę. Stężenie 5 mM tego inhibitora hamuje aktywność enzymu w 60—80% (17, 55).

Kerr i Waisman (cyt. za 11) sugerują, że L-fenylalanina jest aktywnie transportowana z krwi matki poprzez łożysko do płodu. Wysokiemu poziomowi L-fenylalaniny w krwi matki towarzyszy obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej w mózgu płodu, co według autorów jest główną przyczyną opóźnionego rozwoju umysłowego noworodka.

Zainteresowanie ludzką łożyskową fosfatazą alkaliczną wzrosło szczególnie, kiedy stwierdzono w przebiegu raka płuc obecność fosfatazy al-

kalicznej, zbliżonej właściwościami do formy łożyskowej, zarówno w komórkach nowotworowych, jak i surowicy krwi (18, 19). Od nazwiska pacjenta nazwano ją izoenzymem Regana.

Nakayama i wsp. (35) oraz nieco później Akiyuki (3) stwierdzili w przypadkach raka żołądka występowanie w surowicy krwi pacjentów innej formy fosfatazowej, tak zwanego izoenzymu Nagao. Izoenzym ten, w odróżnieniu od izoenzymu Regana, jest hamowany również przez L-leucynę.

Badania Inglisa i wsp. (30) wykazały, że izoenzym Nagao jest rzadko występującą odmianą fenotypu — D normalnej fosfatazy łożyska.

Inne właściwości biochemiczne posiada fosfataza alkaliczna macicy (55). Stwierdzono mianowicie, że pomimo cyklicznego wzrostu poziomu tego enzymu w macicy w poszczególnych fazach cyklu płciowego oraz zmiennej aktywności w różnych odcinkach macicy, istnieje tylko jedna forma molekularna tej fosfatazy. Fosfataza macicy jest hamowana przez dezoksyholan sodu. Natomiast L-fenylalanina przy 5 mM stężeniu hamuje aktywność enzymu w około 30% w fazie pęcherzykowej i lutealnej (55). Mocznik już w stężeniu 3 M całkowicie hamuje aktywność enzymu. Wymienione właściwości odróżniają fosfatazę macicy od formy łożyskowej.

Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej w surowicy krwi może mieć duże znaczenie w diagnostyce stanu czynnościowego macicy. Balbierz i wsp. (7) oraz Nowacki (36) stwierdzili wzrost poziomu alkalicznej fosfatazy w surowicy krwi suk w przebiegu schorzeń narządów rodnych, typu *endometritis* i ropomacicze. Natomiast Pivko i wsp. (39) oraz Golovko i Ravilov (21) wykazali wzrost poziomu alkalicznej fosfatazy w macicy, jajowodach i jajnikach loch pod wpływem wzrastających dawek iniekcyjnych PMS, HCG oraz Grawignostu. Wydaje się, że określanie aktywności fosfatazy alkalicznej może być dodatkowym wskaźnikiem określającym fazę cyklu płciowego.

Funkcja fosfatazy alkalicznej w tkankach i wydzielinach męskiego układu rozrodczego nie jest w pełni wyjaśniona. W rozwoju zarodkowym fosfataza alkaliczna jest wyraźnym wskaźnikiem pojawiania się komórek płciowych (31). Zapewne enzym ten odgrywa istotną rolę w metabolizmie nabłonka płciowego jądra. Aktywność fosfatazy alkalicznej posiadają również najądrza, spełniające ważne funkcje w procesie dojrzewania plemników. Przypuszczalnie fosfataza alkaliczna bierze udział w przemianach białek fosfolipidowych dojrzewających plemników oraz ich błony komórkowej.

Gordon i Dandekar (22, 23) stosując metody histochemiczne wykazali aktywność fosfatazy alkalicznej w błonach komórkowych plemników z ogona najądrzy oraz plemników kapacytowych. Brak aktywności fosfatazy wykazały błony plemników ejakulowanych. Autorzy sugerują udział fosfatazy alkalicznej błony komórko-

wej plemnika w procesie zapłodnienia komórki jajowej. Inaktywowana po ejakulacji fosfataza ulegałaby mianowicie ponownej aktywacji w procesie kapacytacji w żeńskich drogach płciowych plemników. Jak wiadomo proces ten dotyczy głównie proteolizy plazmowych inhibitorów enzymów akrosomowych (24, 57). W następnym etapie fosfataza alkaliczna błony komórkowej kapacytowanego plemnika bierze udział w transporcie jonów Ca^{2+} do zewnętrznej błony akrosomu, aktywując w ten sposób enzymy tej błony. Wynikiem tych reakcji biochemicznych jest faza pęcherzykowa błon akrosomalnych, charakteryzująca się wyciekami enzymów proteolitycznych, które aktywowane jonami wapnia działają na białkowe osłonki komórki jajowej.

Aktywność fosfatazy alkalicznej stwierdzono również w kropli cytoplazmatycznej plemników niektórych ssaków (8, 33). Obecność białka fosfatazowego w kropli wiąże się z udziałem w metabolizmie glikogenu nabłonka najądrzy, dostarczającego materiału energetycznego dojrzewającym plemnikom.

Występowanie fosfatazy alkalicznej w białkach błony komórkowej plemników oraz jej udział w procesie zapłodnienia komórki jajowej było powodem podjęcia badań nad heterogennością tego enzymu oraz lokalizacją w innych strukturach plemnika. Badania wykazały, że w ekstraktach plemników znajdują się 2—4 formy molekularne fosfatazy alkalicznej. Profil tych form wykazał duże zróżnicowanie zarówno u poszczególnych osobników tego samego gatunku, jak również u poszczególnych gatunków zwierząt (9, 14, 38, 56). W przypadku plemników buhaja obecność czterech form molekularnych była związana z dobrymi wskaźnikami jakości ejakulatów i wysoką zdolnością zapładniającą plemników (38, 56).

Obserwacje histochemiczne wykazały, że aktywność fosfatazy alkalicznej zlokalizowana jest głównie w postakrosomalnej części główki, szyjce, wstawce i końcowej części wici plemnika (5). Plemniki ptaków posiadają słabą aktywność fosfatazy alkalicznej, zlokalizowaną w szyjce i wstawce (6). Obecność białek fosfatazowych na powierzchni plemnika wskazuje na ich pochodzenie z różnych odcinków męskiego układu rozrodczego. Według badań Žilcova (58) w porównaniu z aktywnością fosfatazy alkalicznej surowicy krwi, poszczególne odcinki układu rozrodczego tryka wykazywały: 70-krotnie wyższy poziom enzymu w ekstraktach najądrzy, 150-krotnie wyższy w ekstraktach jąder oraz 40-krotnie wyższą aktywność w plazmie nasienia. Płynny sieć jądra oraz gruczołów pęcherzykowych posiadały aktywność fosfatazy alkalicznej zbliżoną do surowicy krwi. W przypadku układu rozrodczego buhaja Glogowski (20) stwierdził wysoką aktywność fosfatazy alkalicznej w głowie najądrzy, płynie sieci i gruczołów pęcherzykowych. Udział wydzielin z poszczególnych odcinków układu rozrodczego decyduje zapewne o ga-

tunkowych różnicach aktywności fosfatazowej w plazmie nasienia. Nasze badania wskazują, że najwyższą aktywność fosfatazy alkalicznej posiada plazma nasienia knura a następnie tryka i buhaja.

Niektórzy autorzy wiążą aktywność fosfatazy alkalicznej w plazmie ze wskaźnikami morfologicznymi nasienia i jego zdolnością zapładniającą. Między innymi Roussel i Stallcup (43) wykazał dodatnią korelację między aktywnością enzymów w plazmie nasienia buhaja a procentem ruchliwych plemników i ujemną korelacją z procentem plemników patologicznych. Natomiast Stallcup (47) stwierdził dodatnią korelację między aktywnością fosfatazy alkalicznej w nasieniu a procentem niepowtarzalności u krów oraz ujemną korelację z koncentracją plemników.

Stosunkowo mało wiemy o biochemicznych właściwościach fosfatazy alkalicznej obecnej w plazmie nasienia zwierząt, zwłaszcza jeżeli chodzi o jej oczyszczoną postać.

W ostatnich latach udało się nam dokonać izolacji i oczyszczenia fosfatazy alkalicznej z plazmy nasienia tryka i buhaja oraz określić właściwości biochemiczne i immunologiczne tego enzymu (20, 49).

Zarówno fosfataza alkaliczna plazmy nasienia buhaja jak i tryka wykazują heterogenność elektroforetyczną uzależnioną obecnością kwasu sjałowego. Desjalizacja komponentów fosfatazowych powoduje obniżenie ich aktywności i zmniejszenie doanodowej ruchliwości.

Formy molekularne fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia buhaja są aktywowane jonami magnezu. Jony te we współdziałaniu z kwasem sjałowym wpływają na temperaturową stabilizację białek fosfatazowych. Formy molekularne fosfatazy plazmy nasienia wykazują optima pH w zakresie 10,9—11,2. Formy te charakteryzuje struktura II rzędowa i złożona budowa podjednostkowa (di- lub trimery białkowe z dodatkowo występującą podjednostką o masie cząsteczkowej 10—15 tys.).

Mimo wielu podobnych właściwości kinetycznych, poszczególne formy molekularne różnią się powinowactwem do substratów oraz stopniem hamowania aktywności przez niektóre inhibitory. Odnosi się to zwłaszcza do białek fosfatazowych plazmy nasienia buhaja.

Dla przykładu: dwie formy molekularne izolowane z plazmy nasienia buhaja posiadają zdecydowanie wyższe powinowactwo do p-nitrofenylofosforanu aniżeli do beta-glicerofosforanu. Jednak w przypadku p-nitrofenylofosforanu obserwuje się duże różnicowanie wartości stałych Michaelisa (K_m) pomiędzy tymi formami. Podobne zależności obserwowano dla izolowanych trzech form molekularnych fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia tryka (49).

Na podkreślenie zasługuje zachowanie się komponentów fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia wobec 3'-nukleotydów. Obok zróżnicowa-

nego tempa hydrolizy tych substratów, pierwsza forma o największej ruchliwości elektroforetycznej, zdecydowanie najszybciej hydrolizuje cytydino 3'-monofosforan (3'-CMP) zaś II forma, ponad 7,5-krotnie szybciej hydrolizuje urydino 3'-monofosforan (3'-UMP), w stosunku do beta-glicerofosforanu.

Wyniki te świadczą, że fosfataza alkaliczna męskiego układu rozrodczego przejmując funkcję hydrolizy 3'-nukleotydów, wspomagając działanie 5'-nukleotydu, które wysoka aktywność w wydzielinach tego układu skierowana jest głównie na 5'-nukleotydy (50, 51). Enzymy te współdziałać mogą z systemem tkankowym nukleaz, związanych z procesami biosyntezy i degradacji kwasów nukleinowych w spermatogenezie lub dojrzewaniu i resorpcji plemników w najądrzu. Również stany patologiczne, spowodowane niedrożnością nasieniowodów charakteryzuje szybki rozpad kwasów nukleinowych w uszkodzonych plemnikach. Fosfataza alkaliczna obok 5'-nukleotydu odgrywa zapewne w tym procesie istotną rolę.

Nie bez znaczenia dla funkcjonowania układu rozrodczego samca jest fakt różnej wrażliwości komponentów białkowych fosfatazy alkalicznej na inhibitory.

L-fenylalanina w znacznym stopniu hamuje aktywność I formy molekularnej fosfatazy alkalicznej. Przy 5 mM stężeniu tego inhibitora obserwowano prawie 90% spadek jego aktywności, podczas gdy II forma hamowana była tylko w 24%.

Fosfataza alkaliczna plazmy nasienia zwierząt należy do enzymów szczególnie wrażliwych na działanie mocznika. Już 3 M jego stężenie całkowicie inaktywuje fosfatazę plazmy nasienia, jak również formy molekularne. Stężenie 2 M mocznika hamuje aktywność białek fosfatazowych w 70—80%. Obserwacja ta może mieć duże znaczenie praktyczne. Przy nadmiernym poziomie mocznika w dawce pokarmowej następować może nie tylko inaktywacja fosfataz tkankowych przewodu pokarmowego, ale również układu rozrodczego. Do tego rodzaju zaburzeń może dochodzić zwłaszcza przy zmianach przepuszczalności barier tkankowych w stanach zapalnych tego układu.

Nasze badania immunologiczne wskazują na antygenowy charakter fosfatazy alkalicznej układu rozrodczego. Strzeżek i Głogowski (49) zaobserwowali w przypadku form molekularnych fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia tryka niezależne hamowanie aktywności po inkubacji ze specyficznymi surowicami odpornościowymi. Jednakże obniżenie maksymalnej szybkości hydrolizy p-nitrofenylofosforanu zbiegało się w tych przypadkach z jednoczesnym wzrostem powinowactwa substratowego izolowanych form molekularnych. Wskazywałoby to na dużą plastyczność poszczególnych form molekularnych fosfatazy alkalicznej układu rozrodczego tryka. Strzeżek (48) obserwował w przebiegu ekspery-

mentalnego zapalenia jąder tryka zmiany profilu elektroforetycznego komponentów fosfatazy alkalicznej oraz tylko 30% spadek aktywności tego enzymu w plazmie nasienia. Autor stwierdził jednocześnie ponad 70% spadek aktywności fosfatazy kwaśnej, zanik niektórych izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej oraz wzrost zawartości kwasu sjałowego i aktywności N-acetylo-glukozaaminidazy.

Z powyższych obserwacji wynikałoby, że fosfataza alkaliczna męskiego układu rozrodczego, w porównaniu do innych enzymów, jest w miarę dobrze chroniona przed aktywnością enzymów proteolitycznych w stanach patologicznych.

Efekt ten jest znacznie lepiej widoczny w przypadku układu rozrodczego buhaja. W naszych badaniach stwierdziliśmy bowiem brak hamowania aktywności form molekularnych fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia buhaja po inkubacji ze specyficzną antysuwrowicą. Surowica ta wywierała natomiast stabilizujący efekt na aktywność enzymu podczas długookresowej inkubacji w temperaturze 50°C.

Biarąc pod uwagę udział fosfatazy alkalicznej w degradacji nukleotydów i metabolizmie estrów fosforanowych, utrzymanie na odpowiednim poziomie jej aktywności, zwłaszcza w przebiegu procesu chorobowego układu rozrodczego, ma istotne znaczenie. Towarzysząca temu procesowi intensywne syntezy przeciwciał, na skutek zmiany przepuszczalności barier tkankowych tego układu, uzasadnia zapewne adaptacyjnie uwarunkowane zjawisko stabilizowania aktywności niektórych enzymów, w tym również fosfatazy alkalicznej.

Przy zastosowaniu metod elektroforetycznych i immunologicznych obserwowaliśmy zróżnicowaną heterogenność fosfatazy alkalicznej w poszczególnych odcinkach układu rozrodczego buhaja. Pozwoliło to na przedstawienie głównych miejsc tkankowej syntezy poszczególnych form fosfatazowych, obecnych w plazmie nasienia. Badania Glogowskiego (20) wykazały, że podstawowym miejscem syntezy, wolno wędrującej w elektroforezie, II formy molekularnej są jądra i gruczoły pęcherzykowe. Natomiast najszybciej wędrująca do anody I forma, syntetyzowana jest przez najądrza a zwłaszcza ogon najądrza. Taka lokalizacja narządowa warunkuje niektóre właściwości biochemiczne tych form.

Badania kinetyczne wykazały istotną rolę kwasu sjałowego w aktywności I formy molekularnej. Najądrze, a zwłaszcza ogon najądrza charakteryzuje się wysokim poziomem kwasu sjałowego (40, 41, 42). Można przypuszczać, że z uwagi na funkcję ogona najądrzy jako głównego magazynu plemników a zarazem miejsca degradacji starzejących się komórek płciowych, obecność formy fosfatazowej o wysokiej aktywności enzymatycznej wydaje się być szczególnie uzasadniona.

Odpowiedni udział wydzielin poszczególnych odcinków układu rozrodczego w ejakulacie de-

cydować może o zróżnicowanej aktywności fosfatazy alkalicznej w nasieniu poszczególnych buhajów. Z naszych obserwacji wynika, że II forma fosfatazy alkalicznej dominuje w ogólnej puli aktywności tego enzymu w plazmie nasienia. Można przypuszczać, że aktywność tej formy w plazmie może być nie tylko wskaźnikiem szybkości metabolizmu estrów fosforanowych, ale także stanu fizjologicznego gruczołów pęcherzykowych. Z kolei aktywność I formy wskazywać może na stan funkcjonalny najądrzy buhaja. Okresowe badanie aktywności tych form w plazmie buhaja może mieć duże znaczenie diagnostyczne.

Reasumując — fosfataza alkaliczna nasienia zwierząt występuje w dwóch lub trzech formach molekularnych. Formy te w męskim układzie rozrodczym związane są bądź z błonami komórkowymi tkanek poszczególnych narządów bądź też z plemnikami. Zróżnicowane właściwości kinetyczne poszczególnych form fosfatazy alkalicznej wskazują na duże zdolności przystosowawcze do zmiennych warunków katalizy enzymatycznej, jak również na wszechstronny udział tego enzymu w procesach biologicznych męskiego układu rozrodczego.

Przedstawione niektóre dane dotyczące fosfatazy alkalicznej w żeńskim i męskim układzie rozrodczym świadczą o wielofunkcyjności tego enzymu. Podjednostkowa budowa białek fosfatazowych powoduje, że poszczególne formy molekularne obdarzone są zwykle niezależnymi właściwościami regulacyjnymi a tym samym dużymi możliwościami adaptacyjnymi do środowiska katalizy enzymatycznej i stanu fizjologicznego układu rozrodczego.

Piśmiennictwo

1. Ahlers J.: *Biochem. J.* 141, 257, 1974.
2. Ahlers J.: *Biochem. J.* 149, 535, 1975.
3. Akiyuki O.: *Taisha* 13, 285, 1976.
4. Aminoff D., Austrins M., Zolfaghari S. P.: *Biochim. biophys. Acta* 242, 108, 1971.
5. Angelova Z.: *Vet. Med. Nauki. Sof.* 4, 81, 1967.
6. Angelova Z.: *Materiały III Międzynarodowego Sympozjum Warna, Bułgaria 1967.*
7. Balbierz H., Nowacki W., Senze A.: *Medycyna Wet.* 32, 348, 1976.
8. Bavdek S., Glover T. D.: *J. Reprod. Fert.*, 22, 371, 1970.
9. Buruana L. M.: *Proc. VIII-th Intern. Congres on Anim. Reprod. Artific. Insem. Kraków, vol. IV, 880, 1976.*
10. Buruana L. M., Dema A.: *Rev. roum. Biochim.* 9, 281, 1972.
11. Cathala G., Brunel C., Chappet-Tordo D., Lazdunski M.: *J. biol. Chem.* 15, 6040, 1975.
12. Cathala G., Brunel C., Chappet-Tordo D., Lazdunski M.: *J. biol. Chem.* 15, 6046, 1975.
13. Chang Ch-H., Moog F.: *Biochim. biophys. Acta* 258, 154, 1972.
14. Dokov V. K., Petkov Z. Z., Angelova Z. V.: *C. r. Acad. Sci. agric. Bulg.* 26, 833, 1973.
15. Dziembor E.: *Post. Bioch.* 16, 89, 1970.
16. Fishman W. H., Ghosh N. K.: *Biochem. J.*, 105, 1163, 1967.
17. Fishman W. H., Ghosh N. K.: *Adv. clin. Chem.* 10, 225, 1967.
18. Fishman W. H., Inglis N. R., Green S., Anstiss C. L., Ghosh N. K., Reif A., Rustigian R. A., Krant M. J., Stolbach L. L.: *Nature, Lond.* 219, 697, 1968.
19. Fishman W. H., Inglis N. R., Stolbach L. L., Krant M. J.: *Cancer. Res.* 28, 150, 1968.
20. Glogowski J.: *Biologiczne właściwości fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia buhaja. Praca dokt. AR-T Olsztyn 1977.*
21. Golovko E. G., Raviłov M. N.: *Biul. nauc. Robot VIZ Dubrovicy.* 38, 8, 1974.
22. Gordon M.: *J. Exp. Zool.* 185, 111, 1973.
23. Gordon M., Dandekar P. V.: *J. Reprod. Fert.* 49, 155, 1977.
24. Gordon M., Dandekar P. V., Bartoszewicz W.: *J. Ultrastruct. Res.* 50, 109, 1975.
25. Gottlieb A. J., Sussman H. H.: *Biochim. biophys. Acta* 160, 167, 1968.
26. Hashimoto T., Sakurai T., Nomoto S.: *Taisha* 13, 279, 1976.
27. Heaton F. W.: *Nature, Lond.* 207, 1292, 1965.
28. Hiwada K., Wachsmuth E. D.: *Biochem. J.*, 141, 283, 1974.

29. Hiwada K., Wachsmuth E. D.: Biochem. J., 141, 293, 1974.
 30. Inglis N. R., Kirley S., Stolbach L. D., Fishman W. M.: Cancer Res. 33, 1657, 1973.
 31. Johnson A. D., Gomes W. R., Vandemerck N. L.: The Testis vol. II, Academic Press, N. Y., London 1970.
 32. Linden G., Mazon P., Michalewski J. B., Alais C.: Biochim. biophys. Acta 358, 82, 1974.
 33. Montem K. A., Glover T. D.: J. Reprod. Fert., 29, 65, 1972.
 34. Moog F., Vire H. R., Grey R. D.: Biochim. biophys. Acta 113, 336, 1966.
 35. Nakayama T., Yoshida M., Kitamura M.: Clinica chim. Acta, 30, 546, 1970.
 36. Nowacki W.: Medycyna Wet. 32, 479, 1976.
 37. Opińska-Blauth J.: Post. Hig. 29, 665, 1975.
 38. Petkov Z. Z., Ivanov I. N., Kichev G. K.: C. r. Acad. bulg. agric. Sci. 26, 1553, 1973.
 39. Pivko J., Majerciak P., Smidt D.: Züchtungskunde 46, 351, 1974.
 40. Prasad M. R. N., Rajalakshmi M.: J. Reprod. Fert. 18, 215, 1973.
 41. Rajalakshmi M., Prasad M. R. N.: J. Endocr. 41, 471, 1968.
 42. Rajalakshmi M., Prasad M. R. N.: J. Endocr. 44, 879, 1969.
 43. Roussel J. D., Stallcup O. T.: J. Reprod. Fert. 12, 423, 1966.
 44. Sagen N., Haram K., Ramsto I.: Acta Obstet. gynecol. scand. 55, 207, 1976.
 45. Saini P. K., Done J.: Biochim. biophys. Acta 258, 147, 1972.
 46. Sakoyama Y.: Seibutsu Butsuri Kagaku 20, 31, 1976.
 47. Stallcup O. T.: J. Dairy Sci. 48, 752, 1965.
 48. Strzeżek J.: Zesz. nauk. ART Olsztyn, Zootechnika 7, 3, 1974.
 49. Strzeżek J., Glogowski J.: Proc. III-th Intern. Symp. Immunol. Warna 60, 1975.
 50. Strzeżek J., Wołos A.: Medycyna Wet., 28, 174, 1972.
 51. Strzeżek J., Wołos A.: Zesz. probl. Nauk roln., 176, 197, 1976.
 52. Sussman H. H., Bowman M.: Nature, Lond. 218, 359, 1969.
 53. Szczekliki E. (pod redakcją) Enzymologia kliniczna, PZWŁ Warszawa 1974.
 54. Wachsmuth E. D., Hiwada K.: Biochem. J., 141, 273, 1974.
 55. Wilson E. W. i wsp.: Fert. Steril. 27, 299, 1976.
 56. Zahariev Z., Kichev G., Ivanov I.: C. R. Acad. Sci. agric. Bulg. 7, 79, 1974.
 57. Zeneveld L., Dragoje B. M., Schumacher G. F. B.: Sciences 177, 702, 1972.
 58. Žilcov Z.: Sbornik naucz. trudov Dubrovicy 1, 1974.

Adres autora: dr Jan Glogowski, Bl. Zoot. p. 233, 10-718 Olsztyn-Kortowo.

STEEN M. WILLADSEN, MARIAN TISCHNER

Międzynarodowa wymiana zarodków owiec przechowywanych in vitro w ciągu 21 miesięcy

Z Zespołu Fizjologii i Biochemii Rozrodu Zwierząt Instytutu Fizjologii Zwierząt, ARC w Cambridge, Anglia
 Z Zespołu Rozrodu Zwierząt Instytutu Stosowanej Fizjologii Zwierząt AR w Krakowie

Bardzo cennym uzupełnieniem techniki transplatacji zarodków stała się w ostatnich latach możliwość ich długotrwałej konserwacji w ciekłym azocie (2). Dzięki tej metodzie została wyeliminowana konieczność stosowania synchronizacji cyklu rujowego u dawcy i biorecy a ponadto została ułatwiona wymiana embrionów na większą odległość.

Celem przeprowadzonego eksperymentu była próba międzynarodowej wymiany zarodków owiec zamrożonych w ciekłym azocie.

Materiał i metody

Maciorki rasy walijska owca górską, pokryte trykiem krzyżówką Jacobs'a użyto jako dawców zarodków. Wczesne zarodki uzyskiwano metodą chirurgiczną w pracowni Zespołu Fizjologii i Biochemii Rozrodu Zwierząt, Instytutu Fizjologii Zwierząt, ARC w Cambridge, Anglia w dniu 31 października 1976 r. Od jednej maciorki po hormonalnej superowulacji uzyskano w 6 dniu od początku rui jedenaście zarodków, w stadium późnej moruli (50—60 komórkowe).

Zarodki przechowywano przez kilka godzin w temperaturze pokojowej w roztworze buforu fosforano-

Tab. 1. Postępowanie przy zamrażaniu i rozmrażaniu zarodków owiec (wg S. M. Willadsena i wsp. (2))

A. Zamrażanie

1. Laparotomia i wypłukiwanie zarodków przy użyciu buforu fosforanowego (PBS), (1) z układu rodnego superowulowanych macierek,
2. Przechowywanie uzyskanych zarodków w PBS w temperaturze pokojowej do 3 godzin,
3. Stopniowe dodawanie w temperaturze pokojowej DMSO (dymetylosulfoleńku) tak, aby końcowa koncentracja DMSO wynosiła 1,5 M.
 Cztery etapy: 0,25 M DMSO w PBS : 5 minut
 0,5 M DMSO w PBS : 5 minut
 1,0 M DMSO w PBS : 10 minut
 1,5 M DMSO w PBS : 20 minut
4. Umieszczenie zarodków w probówkach (0,5 × 5,5 cm), zawierających 0,2 ml 1,5 M DMSO w PBS i schładzanie do temp. -7°C z szybkością 1°C/min.
5. Zapoczątkowanie krystalizacji poprzez „posiew” kryształków na mrożoną pożywkę,
6. Mrożenie z szybkością 0,3°C/min. do -65°C, a od temperatury -65°C do -120°C z szybkością 1°C/min.
7. Przeniesienie probówek do ciekłego azotu.

B. Rozmrażanie

1. Przeniesienie probówek do temperatury -100°C i rozmrażanie z szybkością 10°C/min. do temperatury -10°C,
2. Natychmiastowe podgrzanie do temperatury pokojowej,
3. Usuwanie DMSO z PBS w temperaturze pokojowej:

Sześć etapów: 1,5 M DMSO w PBS : 5 minut
 1,25 M DMSO w PBS : 10 minut
 1,0 M DMSO w PBS : 10 minut
 0,75 M DMSO w PBS : 10 minut
 0,5 M DMSO w PBS : 10 minut
 0,25 M DMSO w PBS : 10 minut
 PBS DMSO w PBS : 10 minut

4. Hodowla in vitro przez 24 godziny w PBS + 20% surowicy owczej pod ciśnieniem powietrza w temp. +38°C lub transplantacja.