

Piśmiennictwo

1. Borzuta K.: Gosp. mięs. 41, (1), 22, 1989.
2. Borzuta K., Męderek R., Mularowicz Z., Wichłacz H., Strzelecki J.: Gosp. mięs. 38, (5), 27, 1986.
3. Borzuta K., Męderek R., Mularowicz Z., Strzelecki J., Wichłacz H.: Gosp. mięs. 38, (6), 11, 1986.
4. Bożyk Z., Rudzki W.: Zarys metod statystycznych stosowanych

- przy badaniu jakości produktów żywnościowych. WNT, Warszawa 1977.
5. Pezacki W.: Przetwarzanie jadalnych surowców rzeźnych. PWN, Warszawa 1984, s. 84.
6. Kede K., Fribisch U., Rahelc S.: Fleischwirtschaft 66, 898, 1986.
7. Ristic S., Živković J., Ančić V.: Tehn. mesa 28, 69, 1987.

Adres autora: doc. dr hab. Władysław Korzniowski, ul. Olszewskiego 6, 10-718 Olsztyn-Brzeziny

ROZRÓD ZWIERZĄT

LUCYNA KAŃSKA, ZDZISŁAW SMORAĞ,
MARIA BAŃ, STEFAN WIERZBOWSKI

Urodzenie cielęcia z zarodka uzyskanego *in vitro*

Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Instytutu Zootechniki,
32-385 Balce k. Krakowa

W dniu 31 marca 1990 r. w Zakładzie Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt Instytutu Zootechniki przeprowadzono poród, w rezultacie którego urodziło się pierwsze cielę pochodzące z zarodka uzyskanego przy zastosowaniu kompleksowej metody *in vitro*, obejmujące zapłodnienie, a następnie hodowlę zarodka, wszystko poza organizmem samicy. Ze względu na znaczną dysproporcję między wielkością cielęcia (41 kg) a matki (352 kg), poród rozwiązano stosując cesarskie cięcie. Przypadek powyższy zasługuje na przedstawienie, bowiem stanowi dowód, co prawda jeszcze jeden z bardzo nielicznych na świecie, możliwości uzyskiwania potomstwa z oocytów pobieranych z jajników krów rzeźnych. Stanowi to równocześnie jedną z możliwości zwiększania wydajności rozrodczej krowy, istotną zarówno w perspektywie programów hodowlanych, jak i produkcji zwierzęcej.

U większości gatunków ssaków, w tym również bydła, znaczny odsetek oocytów pobranych z pęcherzyków jajnikowych, a następnie hodowanych przez około 24 godziny *in vitro*, osiąga stadium metafazy II. Stosowane w latach 70-tych i pierwszej połowie lat 80-tych metody hodowli oocytów pozwalały wprawdzie na uzyskiwanie wysokiego, bo osiagającego nawet ponad 80% odsetka oocytów wykazujących dojrzałość jądra (10), jednakże zdolność tak dojrzewających oocytów do zapłodnienia, a szczególnie rozwoju zarodkowego, była bardzo ograniczona (2, 10, 11). Dopiero w ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w rozwoju metody. Osiągnięto go zachowując ściśle określone proporcje między liczbą hodowanych oocytów, ilością komórek ziarnistych pęcherzyka a objętością użytej do hodowli pożywki. Równocześnie opracowano szereg metod kapacytacji nasienia buhaja *in vitro*, pozwalających na właściwe przygotowanie plemników do zapłodnienia pozaustrojowego (1, 4, 8, 9, 14, 15). Istotny postęp nastąpił również w rozwoju metod hodowli zarodków wczesnych stadiów rozwojowych. Był on rezultatem zastosowania techniki współhodowli zygot z komórkami nabłonka jajowodu bydłowego (7, 13). Metoda umożliwia hodowlę zygot bydłowych do stadium moruli/blastocysty z zachowaniem zdolności do pełnego rozwoju *in vitro*.

Pierwsze cielęta urodzone po przeniesieniu blastocyst otrzymanych w wyniku dojrzewania, zapłodnienia i hodowli *in vitro*, uzyskali w 1988 r. Lu i wsp. (13), a następnie Pavlok i wsp. (15); o uzyskaniu cię-

żarnych biorczyń donoszą również inni autorzy (1, 8). Efektywność metody oceniana zarówno na podstawie odsetka uzyskanych blastocyst, jak i wycielonych biorczyń, jest jednak stosunkowo niska.

Celem podjętych badań było określenie możliwości produkcji zarodków z dojrzewających i zapłodnianych *in vitro* pęcherzykowych oocytów bydłowych, ich pozaustrojowego rozwoju do stadium moruli/blastocysty oraz zdolności do pełnego rozwoju *in vivo*.

Material i metody

Jajniki pobierano bezpośrednio po uboju jałówek i krów rzeźnych, przetrzymywano w płynie PBS uzupełnionym antybiotykami w temperaturze około 35°C (dla uzysku oocytów) lub 4°C (dla uzysku komórek ziarnistych) i przewożono do laboratorium.

Pobieranie oocytów i warunki hodowli. Oocyty uzyskiwano z 2–6 mm pęcherzyków jajnikowych w drodze nacinania powierzchni jajnika. Uzyskane oocyty poddawano selekcji morfologicznej. Do hodowli przeznaczano jedynie oocyty otoczone ścisłą i spoiwą warstwą komórek wzgórką jajonośnego i nie wykazujące zmian atretycznych w cytoplazmie (10). Pożywkę do hodowli stanowiło uzupełnione podłoże TC 199 — sól Earla, zawierające 20% inaktywowanej surowicy bydłowej. Ponadto do hodowli dodawano populację komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego, uzyskiwanych z nieatretycznych pęcherzyków jajnikowych o średnicy 7–15 mm. Zawartość pęcherzyków poddawano ocenie pod mikroskopem stereoskopowym. Uzyskane komórki ziarniste przemywano trzykrotnie w płynie TC 199, a następnie zawieszano w niewielkiej ilości tego płynu, dodając do współhodowli z oocytami 3–5 × 10⁶ komórek na 1 ml pożywki. Hodowlę przeprowadzano w systemie niestatycznym, w temperaturze 39°C i atmosferze 5% CO₂ w powietrzu, przez okres 23–24 godzin.

Kapacytacja nasienia i zapłodnienie *in vitro*. Do zapłodnienia używano mrożonego nasienia 2 buhajów: rasy ncb i Simental* Po rozmrożeniu w temperaturze 38°C plemniki przemywano przez odwirowanie w ciągu 10 minut przy 700 g, a następnie poddawano rozdzielaniu techniką podpływania (swim-up: najbardziej ruchliwe plemniki podpływają w górne partie pożywki i te plemniki używane są do zapłodnienia) (14). Aby to umożliwić osad ostrożnie nawarstwiano 0,8 ml pożywki i pozostawiano w temperaturze 39°C przez 45 minut. Po tym czasie pobierano 0,5–0,6 ml zawiesiny plemników, do której dodawano heparynę w ilości 10 j.m. na 1 ml (15). Następnie sprawdzano ruchliwość i koncentrację plemników. Do zapłodnienia dodawano 1–1,5 × 10⁶ plemników na 1 ml pożywki. Pożywkę do kapacytacji i zapłodnienia *in vitro* stanowiło podłoże TC 199 uzupełnione 10% bydłowej surowicy rujowej. Po zakończeniu hodowli oocyty pozbawiano mechanicznie (przy użyciu pipetki) większości otaczających

* Użyte nasienie pochodziło z produkcji 1976 r.

Tab. 1. Wyniki zapłodnienia pozaustrojowego oocytów bydłych i rozwój *in vitro* uzyskanych zygot

Liczba oocytów		Liczba dzielących się zarodków (%)	Stwierdzone stadia rozwoju jaj i zarodków poddanych hodowli <i>in vitro</i> (%)					
użytych	zapłodnionych (%)		1 komórkowe	2-8 komórkowe	morule	blastocysty	nieprawidłowy rozwój	jaja polispermiczne
136	93 (68,3)	30 (22,0)	43 (31,6)	15 (11,0)	1 (0,7)	6 (4,4)	13 (9,5)	15 (11,0)

Tab. 2. Wyniki przenoszenia blastocyst bydłych uzyskanych *in vitro*

Jałówka	Ruja	Przeniesione zarodki	Wyniki badania rektalnego	Wycielenia
603	20.06. 1989	27.06. 1989	wczesna blastocysta + 21.08.1989 średnia blastocysta	♂ 31.03. 1990 (41 kg)
498	20.06. 1989	28.06. 1989	ekspandująca blastocysta — 21.08.1989	—
501	29.06. 1989	05.07. 1989	średnia blastocysta — 21.08.1989	—
505	29.06. 1989	05.07. 1989	wczesna blastocysta — 21.08.1989 wczesna blastocysta	—

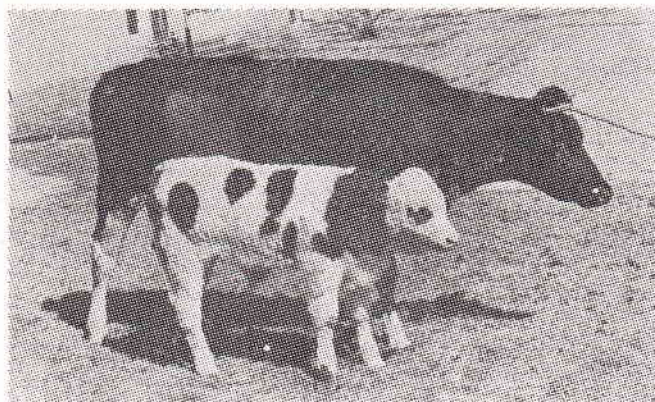
je komórek ziarnistych, przepłukiwano w płynie do zapłodnienia, a następnie umieszczano w 2 ml tego płynu, dodając kapacytowane plemniki.

Incubację obu rodzajów gamet przeprowadzano w cieplarni o regulowanej zawartości CO₂, w temperaturze 39°C przez 16–20 godzin. Po tym czasie z powierzchni oocytów usuwano mechanicznie komórki korony promienistej i przylegające plemniki, przemywano w płynie TC 199 + 20% surowicy ruiowej i umieszczano w hodowli.

Hodowla uzyskanych zygot. Zygoty uzyskane w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego przetrzymywano we współhodowli z komórkami nabłonka jajowodowego (3, 7, 13) aż do momentu osiągnięcia stadium blastocysty, co wymagało 7-dniowej hodowli. Uzyskane blastocysty przenoszono metodą niechirurgiczną zsynchronizowanym jałówkom-biorczyniom w 7 dniu po rui. Natomiast komórki jajowe oraz zarodki zahamowane w rozwoju utrwalano w kwaśnym alkoholu (alkohol etylowy i kwas octowy = 3:1), barwiono 2% roztworem orceiny i oceniano w mikroskopie fazowo-kontrastowym.

Wyniki i omówienie

Ogółem do hodowli użyto 136 niedojrzałych oocytów bydłych. Zapłodnienie stwierdzono u 93 (68,3%) oocytów, a podziały zarodkowe wykazywało 30 (22,0%) zygot. W wyniku 7-dniowej hodowli uzyskano 6 blastocyst i jedną morulę (5,1%) (tab. 1). Rozwój pozostałych zarodków uległ zahamowaniu w stadiach od 1 do 8 blastomerów, bądź miał przebieg nieprawidłowy. Tę ostatnią grupę stanowiły zarodki, które posiadały więcej niż jedno jądro w blastomerze, zarodki z nierównomiernie rozwijającymi się blastomerami, zygoty, w których stwierdzano podział jąder bez równoczesnego podziału cytoplazmy oraz oocyty z wykształconym przedjądrem żeńskim i zahamowanym w rozwoju przedjądrem męskim. Występowanie anomalii rozwojowych na porównywalnym poziomie obserwowali Iwasaki i wsp. (9). Uzyskanych 6 blastocyst przeniesiono metodą niechirurgiczną czterem zsynchronizowanym jałówkom-biorczyniom. Ciążę stwierdzono u jednej jałówki (tab. 2). W wyniku porodu, który nastąpił w 283 dniu ciąży, uzyskano buhajka (ryc. 1), którego umaszczenie i cechy budowy wskazują, że ojcem był buhaj rasy simentalskiej.

Ryc. 1. Buhajek urodzony w wyniku rozwoju zarodka otrzymanego w efekcie dojrzewania, zapłodnienia i hodowli *in vitro* pęcherzykowych oocytów bydłych

O matce nic nie wiadomo, bo jak powiedziano w metodyce, oocyty były pobierane z jajników bydłych uzyskiwanych z materiału rzeźnego.

Zastosowana metoda pozwala więc na uzyskiwanie zarodków zdolnych do prawidłowego rozwoju *in vitro*, jak i pełnego rozwoju *in vivo*. Niemniej jednak osiągnięta efektywność jest niska, choć porównywalna z dotychczas publikowanymi wynikami (13, 15). Efektywność metody można wprawdzie zwiększyć przenosząc zygoty uzyskane w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego do jajowodu biorczyń pośrednich (1, 3, 6, 12, 16, 17), jednakże takie rozwiązanie stwarza z praktycznego punktu widzenia, znaczne komplikacje. Dalsze prace powinny się więc koncentrować na zwiększaniu efektywności poszczególnych etapów metody, a zwłaszcza prawidłowego dojrzewania oocytów, zapłodnienia pozaustrojowego i hodowli zarodków wczesnych stadiów rozwojowych.

Piśmiennictwo

1. Aoyagi Y., Fukui Y., Iwazumi Y., Urakawa M., Minegishi Y., Ono H.: *Theriogenology* 31, 168, 1989.
2. Ball G. D., Leibfried M. L., Lenz R. W., Ar R. L., Bavister B. D., First N. L.: *Biol. Reprod.* 28, 717, 1983.
3. Boland M. P.: *Theriogenology* 21, 126, 1984.
4. Brackett B. G., Bousquet D., Boice M. L., Donawick W. J., Evans J. F., Dressel M. A.: *Biol. Reprod.*, 27, 147, 1982.
5. Critser E. S., Leibfried-Rutledge M. L., Eyestone W. H., Northey D. L., First N. L.: *Theriogenology* 26, 150, 1986.
6. Ectors F. J., Van Der Zwalmen P., Touati K., Beckers J. F., Ectors F.: *Theriogenology* 31, 188, 1989.
7. Eyestone W. H., Vignieri J., First N. L.: *Theriogenology* 27, 228, 1987.
8. Goto K., Kajihara Y., Kosaka M., Koba M., Nakanishi Y., Ogasawa K.: *J. Reprod. Fert.*, 83, 753, 1988.
9. Iwasaki S., Shioya Y., Masuda H., Hanada A., Nakahara T.: *Gamete Res.*, 22, 83, 1989.
10. Kątska L.: Określanie warunków hodowli *in vitro* izolowanych oocytów bydłych. Praca dokt. Instytut Zootechniki Balice, 1984.
11. Leibfried-Rutledge M. L., Critser E. S., First N. L.: *Biol. Reprod.* 35, 850, 1986.
12. Lu K. H., Gordon I., Gallagher M., Mc Govern H.: *Vet. Rec.* 121, 259, 1987.
13. Lu K. H., Gordon I., Chen H. B., Gallabher M., Mc Govern H.: *Vet. Rec.* 122, 539, 1988.

14. Parrish J. J., Susko-Parrish J. L., Leibfried-Rutledge M. L., Crister E. S., Eyestone W. H., First N. L.: *Theriogenology* 25, 1983.
15. Pavlok A., Motlik J., Kańka J., Fulka J.: *Reprod. Nutr. Dev.* 29, 611, 1989.
16. Strard M. A., Labmert R. D., Menard D. P., Bedaya M.: *J. Reprod. Fert.* 75, 551, 1985.
17. Xu K. P., Greve T., Callesen H., Hyttel P.: *J. Reprod. Fert.* 81, 501, 1987.

Adres autora: dr Lucyna Kątska, ul. Rejtana 8/4, 30-510 Kraków

HALINA MILLER-PODRAZA, EWA SKARŻYŃSKA, ALEKSANDRA SAFIANOWSKA *,
LESZEK HRYCKIEWICZ **, LESZEK TOMASZEWSKI

Glikosfingolipidy plemników buhaja

Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej Instytutu Biofarmacji, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
* Zakład Biochemii Instytutu Hematologii, ul. Chocimska 5, 02-957 Warszawa
** Wojewódzka Lecznica dla Zwierząt, ul. Bolesława Bieruta 72, 75-816 Koszalin

Summary

Glycosphingolipids of bull's spermatozoons

In bull's spermatozoons the presence of sphingosine glycolipids was verified. The neutral glycosphingolipids do not surpass $1.5 \mu\text{g}/10^8$ cells, gangliosides $0.2 \mu\text{g}/10^8$ cells. Between them quantitatively prevailed glycosylceramide (Glc-Cer) and trinexosylceramide. No one of studies compounds contained hexosamines. The bulk of acid glycosphingolipids showed the chromatographic motility typical for gangliosides GM3 (Sial-Gal-Glc-Cer).

The content of glycosphingolipids of bulls spermatozoons is inconsiderable. Their role is still obscure. There is a need for further research aimed at the elucidation of their biological function.

Glikolipidy sfingozynowe (glikosfingolipidy) stanowią niejednorodną grupę związków lipidowych wchodzących w skład błon komórkowych zwierząt i człowieka (15, 17, 31). Związki te zostały wyizolowane z wielu tkanek i szczegółowo scharakteryzowane (2, 3, 5, 8, 10, 28). Słabo poznany pod względem składu glikosfingolipidowego pozostaje ciągle układ rozrodczy, w tym nasienie ludzkie i zwierzęce.

Wiadomo obecnie, że głównym glikolipidem jąder i nasienia ssaków jest tzw. seminolipid, chemicznie opisywany jako sulfo-galaktozylo-acylo-alkilo-glicerol ($\text{SO}_3\text{H} \rightarrow 3\text{Gal} - \text{AAG}$) lub sulfo-galaktozylo-dwuacylo-glicerol ($\text{SO}_3\text{H} \rightarrow 3\text{Gal} - \text{DAG}$) (4). Jądra i nasienie ssaków zawierają również glikolipidy sfingozynowe (6, 8, 21, 22). W 1987 r. Ritter i wsp. (22) wyizolowali i scharakteryzowali glikosfingolipidy z nasienia ludzkiego. Otrzymali oni glikosfingolipidy obojętne i gangliozydy z plemników w ilości $44 \pm 0,9$ i $22,1 \pm 1,7$ nmola/ 10^8 komórek. W płynie nasiennym stwierdzili obecność $4,1 \pm 0,6$ nmola gangliozydów/ml i $29 \pm 1,5$ nmola glikosfingolipidów obojętnych/ml. Głównymi glikosfingolipidami obojętymi nasienia były: mono-, dwu-, trój- i czteroheksyloceramidy typu krwinkowego (tzw. serii globo), wśród gangliozydów przeważały sjało i dwusjało-laktozyloceramidy (wg nomenklatury Svennerholma (29) gangliozydy GM3 i GD3).

Celem tej pracy była próba izolacji i charakterystyki glikosfingolipidów plemników buhaja.

Materiał i metody

Glikosfingolipidy izolowano z pulowanego nasienia buhajów pobranego z W.Z.Wet. w Koszalinie. Wzorcowe gangliozydy: GM3, GM1, GD1a, GD1b oraz glukozylceramid otrzymano od p. dr T. Pacuski Z Instytutu Hematologii. Wzorcowy tetraheksyloceramid (asjalogangliozyd) przygotowano z gangliozydów mózgu wołowego firmy Koch Light.

Preparatyka glikosfingolipidów. Nasienie buhajów (łącznie 450 ml) wirowano stosując obroty 14000/min (MPW 310, Mechanika Precyzyjna). Osad homogenizowano z wodą (150 ml) i ekstrahowano 600 ml mieszaniny chloroformu z metanolem (1:2 stos. objętościowy) przez 2 godziny w temp. 37°C . Następnie zawiesinę wirowano i osad reekstrahowano dwa razy stosując mieszaninę chloroform : metanol = 1 : 2 (50 ml) i mieszaninę chloroform : metanol = 1 : 1 (50 ml). Połączone ekstrakty odparowano na obrotowej wyparce próżniowej i z otrzymanego materiału izolowano glikosfingolipidy obojętne i gangliozydy stosując standardowe metody tj. hydrolizę alkaliczną, odsolenie, chromatografię jonowymienną na DEAE-Sephadexie A-25 oraz chromatografię kolumnową i cienkowarstwową na kwasie krzemowym (19). Do rozdzielania glikosfingolipidów obojętnych na kolumnie z kwasu krzemowego stosowano dolną fazę układu powstałego przez zmieszanie chloroformu : metanolu : wody w stosunku objętościowym 65 : 30 : 8. Preparatywne chromatogramy cienkowarstwowe z naniesionymi gangliozydami i glikosfingolipidami obojętymi rozwijano w tych samych układach co w metodach analitycznych. Chromatogramy wybarwiano jodem i materiał z zaznaczonych pól, po zeszkobaniu ze szkła, ekstrahowano nadmiarem mieszaniny chloroform : metanol = 1 : 1 i 1 : 2 w przypadku glikosfingolipidów obojętnych i nadmiarem mieszaniny chloroform : metanol = 2 : 3 w przypadku gangliozydów. Gangliozyd GM3 czyszczono dodatkowo drogą acetylacji. Glikolipid acetylowano w mieszaninie pirydyny i bezwodnika octowego (stosunek objętościowy 3 : 2) przez noc w temp. pokojowej. Następnie po odparowaniu rozpuszczalników nakładano na kolumnkę z kwasu krzemowego. Stosowano w tym przypadku jako układ rozwijający mieszaninę chloroformu : metanolu : wody = 90 : 10 : 1.

Metody analityczne. Sfingozynę oznaczano wg Lautera i Tramsa (11). Cukry analizowano drogą chromatografii gazowej po uprzednim przekształceniu ich w etery sjałowe (33). Metodą chromatografii gazowej rozdzielano także kwasy tłuszczowe. W celu wykrycia hydroksykwasów analizę prowadzono przed i po reakcji z odczynnikiem sjali-lującym (32). Chromatografię cienkowarstwową wykonywano na płytkach firmy Merck, fabrycznie powleczonych kwasem krzemowym. Przy rozdzielaniu gangliozydów stosowano układ rozwijający chloroform : metanol : woda : 2% CaCl_2 = 60 : 35 : 7 : 1, przy analizie glikosfingolipidów obojętnych używano fazy dolnej powstałej po zmieszanii chloroformu : metanolu : wody = 65 : 30 : 8. Glikosfingolipidy obojętne wybarwiono na płytkach odczynnikiem orcyńolowym (10, gangliozydy — odczynnikiem rezorcynolowym (19).

Wyniki i omówienie

Stosując standardowe metody izolacji otrzymano z plemników buhaja szereg glikosfingolipidów obojętnych i kwaśnych (gangliozydów). Na podstawie ilościowej oceny chromatogramów cienkowarstwowych dokonywanych na wstępnych etapach preparatyki oszacowano, że zawartość glikosfingolipidów obojętnych w plemnikach była nie mniejsza niż $1,5 \mu\text{g}/10^8$ komórek, zawartość gangliozydów nie mniejsza niż $0,2 \mu\text{g}/10^8$ komórek. Daje to łączną wartość $1,7 \mu\text{g}$ czyli $1,7 \text{ nmola}/$