

JERZY STRZEŻEK, WACŁAW MINAKOWSKI  
*Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt WSR, Olsztyn*

## OSIĄGNIĘCIA W DZIEDZINIE BIOLOGII ROZRODU ZWIERZĄT

### NIEKTÓRE ASPEKTY BIOCHEMICZNE PLEMNIKÓW I PLAZMY NASIENIA

Rozród zwierząt jest złożonym procesem biologicznym, którego poznanie sprawia dużo trudności zarówno genetykom, morfologom, cytologom, jak i biochemikom.

Rozwój hodowli zwierząt, jej intensyfikacja, naukowe podstawy doskonalenia ras, szerokie zastosowanie sztucznego unasienniania zwierząt wymagają intensywnych badań poszczególnych etapów procesu rozmnażania, a między innymi morfologii, biologii i biochemii komórek płciowych.

W artykule niniejszym, który traktujemy jako pierwszy z cyklu artykułów dotyczących rozrodu zwierząt, zajmiemy się chemizmem plemników i plazmy nasienia.

#### *Akrosom i jego rola enzymatyczna*

Plemnik jest wysokozróżnicowaną komórką składającą się zasadniczo z trzech części: główki, wstawki i witki. Powierzchnia główki pokryta jest cienką błoną (podobną do keratyn), okrywającą również wstawkę i witkę plemnika. Pod błoną znajduje się akrosom w postaci czapeczki okrywającej 2/3 przedniej części plemnika ssaków.

Rola akrosomu poznana została już dość dawno. Przypisywano mu udział w procesie przenikania plemnika przez osłonki jajowe z uwagi na wysoką aktywność hialuronidazy. Ostatnie lata przyniosły szereg spostrzeżeń, które do pewnego stopnia wyjaśniły tzw. reakcję akrosomową plemnika w czasie zapłodnienia jaja.

Hartree i Srivastava (27) stosując kationowy detergent Hyamine 2389 (sole dodecylowe) opracowali metodę otrzymywania zawiesin akrosomów z plemników buhaja i tryka. Poprzez ekstrakcję otrzymali oni dwie frakcje A i B, które okazały się lipoglikoproteidami zawierającymi około 20% lipidów. Lipidy akrosomów (zwłaszcza z frakcji B) wykazywały duże

podobieństwo do lipidów plemników, charakteryzujących się znaczną zawartością fosfolipidów (plazmalogenów i lecytyn — Hartree i Mann (28). Sucha masa frakcji A zawierała 79,6% substancji niedializujących, 10,6% substancji dializujących; frakcja B odpowiednio — 76,7%, 10,2% i 13,1%. W substancjach dializujących stwierdzono minimalne ilości aminokwasów i cukrów. Analiza chemiczna substancji niedializujących w obu tych frakcjach wykazała obecność w przeważającej ilości kwasu glutaminowego i asparaginowego oraz mannozy, galaktozy, glukozoaminy i kwasu sjałowego. Wyniki analiz przedstawia tab. 1.

Tabela 1

Zawartość cukrów, aminokwasów, kwasu sjałowego i aminocukrów w glikoproteidach A i B akrosomów plemnika tryka (wg 27)  $\mu\text{moli/g}$

	A	B
<b>C u k r y</b>		
Fukoza	14	19
Galaktoza	62	71
Mannoza	93	121
Galaktozoamina	45	53
Glukozoamina	98	119
Kwas sjałowy	14	37
<b>A m i n o k w a s y</b>		
Lizyna	485	455
Histydyna	159	144
Arginina	330	290
Kwas asparaginowy	822	736
Treonina	498	448
Seryna	611	560
Kwas glutaminowy	980	720
Prolina	575	405
Glicyna	605	545
Alanina	615	535
Cysteina	66	84
Walina	472	429
Metionina	166	138
Izoleucyna	346	314
Leucyna	743	614
Tyrozyna	236	228
Fenylalanina	304	295

W dalszych badaniach nad kompleksem glikolipoproteidowym akrosomów plemników (LPG) tryka, buhaja i królika Srivastava i wsp. (52) stwierdzili jego dużą aktywność proteolityczną i hialuronidazową. Kom-

pleksy LPG zdolne były do rozbicia osłonek komórki jajowej *cumulus oöphorus* i *corona radiata* świeżo owulowanych jaj królika oraz atakowały również *zona pellucida*. Aktywność hialuronidazy LPG tryka wynosiła 940 jednostek mętności na mg kompleksu a buhaja 43 jednostki na mg. Niska aktywność hialuronidazy w LPG buhaja mogła być spowodowana przenikaniem tego enzymu z akrosomów do plazmy nasienia. Najwyższą aktywność proteolityczną LPG wykazywały akrosomy plemników tryka.

Ostatnio Zaneveld i wsp. (66) stwierdzili w akrosomach królika aktywność trypsyno-podobnego enzymu (TLE — trypsin like enzyme). Aktywność TLE była kilkakrotnie wyższa w plemnikach otrzymanych z najądźra aniżeli w plemnikach ejakulowanych. Plemniki uzyskane z macicy (kapacytowane) posiadały wyższą aktywność TLE od plemników z ejakulatu (tab. 2).

Tabela 2

## Aktywność TLE w akrosomach plemników królika (wg 66)

Ekstrakt plemników	Jednostek TLE/mg białka
najądźra	84—430
ejakulatu	0—10
ejakulatu (oczyszczone na DEAE)	40—150
kapacytowane	80—130

Aktywność TLE plemników z najądźra jest hamowana przez sojowy inhibitor trypsyny, zaś 2-merkaptoetanol (w stężeniu 10 mM) hamuje jego aktywność w 50%. Na podstawie otrzymanych wyników autorzy wnioskuje o obecności inhibitora TLE — akrosomów w plazmie nasienia oraz o możliwości jego usunięcia w procesie kapacytacji plemników macicy.

Allison i Hartree (1) donieśli o obecności w kompleksie LPG akrosomów tryka enzymów lizosomalnych jak: kwaśnej fosfatazy, arylosulfatazy, beta-N-acetyloglukozoamidazy, fosfolipazy A, katepsyny C oraz proteaz denaturujących hemoglobinę (tab. 3).

Srivastava i wsp. (53) stwierdzili dodatkowo obecność neuraminidazy w akrosomach plemników buhaja, tryka, królika i chomika. Enzym ten (NLF — neuraminidase like factor) wykazuje podobieństwo do neuraminidazy ssaków. Inkubacja w 310°K przy pH = 6,0 mucyny gruczołu Cowpera knura, powodowała w obecności enzymu, uwolnienie kwasu sjałowego. NLF jest enzymem o dużej specyficzności substratowej. Odszczepia mianowicie kwas sjałowy od komponentów niskomolekularnych i nie działa na wiązania glikozydowe 2—3. Optimum działania enzymu przy-

Tabela 3

Aktywność kwaśnej fosfatazy (AP), arylosulfatazy (AS) i beta-N-acetyloglukozoamidazy (A) we frakcjach po przemyciu plemników tryka (TRIS-HCl) oraz we frakcjach akrosomowych  $H_1$  i  $H_2$  (wg 1), ( $\mu$ moli substratu rozszczepionego w ciągu 30 minut w 310°K w przeliczeniu na 1 ml nasienia)

	AP	AS	A
Przemycia 1+2+3	39,7	25,3	237
Przemycie 4	0,7	0,8	4,5
Plazma nasienia	27,0	24,1	136
Akrosomowe frakcje			
$H_1$	7,8	0,6	16,8
$H_2$	9,2	1,0	14,6

pada na pH = 6,0. Zwiększenie stężenia substratu powyżej optimum powodowało wzrost lepkości i hamowało jego aktywność. Chromatografia ekstraktów akrosomowych na DEAE — celulozie wykazała 5 frakcji, z których pierwsza posiada najwyższą aktywność NLF. Aktywność enzymu obniżała się w ciągu 5 minut po podgrzaniu w 373°K. Przy inkubowaniu ekstraktu NLF (0,001  $\mu$ g) ze 150  $\mu$ g tzw. „czynnika dekapacytacji” (otrzymanego z plazmy nasienia) i dodaniu 8 mg mucyny gruczołu Cowpera stwierdzano po 10 min. inkubacji całkowite zahamowanie aktywności preparatu NLF. Aktywność enzymu wracała po 6-godzinnej dializie w 277°K; stwierdzono wówczas przejście czynnika dekapacytacji do płynu dializacyjnego. Autorzy wnioskują o wpływie czynnika DF na strukturę przestrzenną substratu. Podobne wyniki otrzymali Zanevald i wsp. (67) dla trypsynopodobnego enzymu akrosomów królika. Inkubacja plemników z najądry z plazmą nasienną *in vitro* znacznie obniżała aktywność enzymu. Na podstawie w/w prac należy sądzić o obecności w plazmie nasienia inhibitora lub inhibitorów powodujących inaktywację enzymów akrosomowych.

Wszystkie przytoczone badania wyraźnie wskazują na zdolność enzymatyczną akrosomów plemników zwierząt do penetracji osłonek komórki jajowej. Hialuronidaza, jako jeden z enzymów akrosomu, jest zdolna wg niektórych autorów (27) rozszczepiać jedynie *cumulus oöphorus*. Nie bez znaczenia jest bowiem obecność dwóch błon akrosomowych: zewnętrznej — uwalniającej hialuronidazę w reakcji akrosomowej oraz wewnętrznej zaangażowanej w atakowaniu *zona pellucida* i uwalniającej enzymy proteolityczne akrosomu.



Podsumowując należy traktować akrosomy jako wyspecjalizowane lizosomy, które ułatwiają proces zapłodnienia jaja u wielokomórkowych organizmów. Akrosomy — to również składniki plemnika, które posiadają struktury białkowe o właściwościach antygenów.

### *Kwasy dezoksyrybonukleinowe*

Plemniki ssaków zawierają połowę ilości DNA w stosunku do komórek somatycznych. Synteza DNA następuje w pierwszej fazie spermatogenezy, to jest w spermacytogenezie. Stosunkowo wiele prac poświęcono badaniom zawartości DNA w plemnikach różnych gatunków zwierząt (4, 5, 36, 39, 45, 54). Badania wykonywano różnymi metodami, jak cytofotometryczną, mikrospektrofotometrii UV oraz ekstrakcyjną, co powodowało szereg sprzeczności. Plemniki normalne, od płodnych osobników, z reguły posiadają stałą zawartość DNA, oczywiście w pewnym zakresie wartości. Bouters i wsp. (7) badając metodą mikrospektrofotometrii UV oraz metodą cytofotometryczną zawartość DNA w plemnikach wyizolowanych z różnych partii układu rozrodczego, stwierdzili rozbieżność w otrzymanych wynikach. Przy oznaczaniu metodą cytofotometryczną otrzymali wyższe zawartości DNA w plemnikach uzyskanych z najądrza, aniżeli w plemnikach ejakulatu. Podobne sprzeczności zaobserwowano w przypadku nasienia przechowywanego.

Można przypuszczać, że przyczyną otrzymywania różnych wyników są między innymi zmiany metaboliczne DNA oraz zmiany dotyczące powiązań między DNA a białkiem, zwłaszcza w czasie przechowywania nasienia.

Borenfreund i wsp. (6) opracowali metodę izolacji natywnego DNA z plemników ssaków, używając do rozbicia keratynowej błony plemnika 2-merkaptoetanolu. Dało to możliwości badań porównawczych izolowanego DNA ze świeżych i przechowywanych plemników.

Salisbury i wsp. (58) badając skład zasad DNA ekstrahowanych ze świeżych plemników buhaja (T — 31,7%, C — 22,4%, G — 20,4%, A — 25,6%) oraz po 24 godz. przechowywaniu nasienia nie stwierdzili różnic w procentowym występowaniu cytozyny i guaniny. Zmiany nie wystąpiły również na skutek depolimeryzacji DNA w czasie kilkunastodniowego przechowywania nasienia (tab. 4).

Ciekawe doświadczenia dotyczące wpływu przechowywanych gamet męskich na proces zapłodnienia i rozwój embrionalny przeprowadzili Hart i Salisbury (29) na żabie płowej. Używając do zapłodnienia zestarzałych gamet męskich autorzy stwierdzili, że znaczna liczba świeżo zapłodnionych jaj zahamowała swój rozwój w stadium gastrulacji. Ilość oraz włas-

Tabela 4

Srednie temperatury denaturacyjne DNA dla świeżego  
i przechowywanego nasienia buhaja (wg 58)

Wiek nasienia dni	Liczba prób	Średnia temperatura topnienia w °C
0	6	86,48
3—4	9	86,41
7—8	9	86,38
15	3	86,27

ciwości DNA zahamowanej w rozwoju gastruli odpowiadały gastruli kontrolnej, normalnie rozwijającej się.

RNA ekstrahowany z normalnej gastruli i iniekcjowany do jaj zapłodnionych przez starzejące się plemniki hamował całkowicie metabolizm. Według autorów wskazywać to może na uszkodzenie lub zablokowanie mechanizmu transkrypcji lub translacji w stadium gastruli przez zestarzałe plemniki. Hart (30) na podstawie testów immunologicznych, stwierdził w przypadku normalnie rozwijającej się gastruli dwa dodatkowe, wyraźnie zróżnicowane białka w odróżnieniu od gastruli, której rozwój był zahamowany. Zdaniem autora wskazywałoby to na zablokowanie procesu translacji w stadium gastruli przez prawdopodobnie zmieniony DNA plemnika zestarzałego.

Graves i Salisbury (23) wykazali metaboliczną niestalość takiego DNA, obserwując *in vitro* włączanie się grupy metylowej ze znakowanej  $C^{14}$ -2-glicyny do tyminy DNA (tab. 5). Wyniki te autorzy potwierdzili metodą

Tabela 5

Inkorporacja glicyny 1- $C^{14}$  i glicyny 2- $C^{14}$  do różnych frakcji plemnika i zasad DNA podczas 4 godz. inkubacji w 310°K

Frakcje	Glicyna 1- $C^{14}$ dpm/10 <sup>8</sup> plem.	Glicyna 2- $C^{14}$ dpm/10 <sup>8</sup> plem.
Kwaso-rozpuszczalna	10817	12439
Lipidy	2100	6887
Kwas nukleinowy	5648	4798
Adenina	22	20
Cytozyna	37	62
Guanina	35	72
Tymina	92	320*
Białko	665	528
CO <sub>2</sub> (produkt degradacji aminokwasów)	2176	1656

radioautografii. Inkorporacja dotyczyła wyłącznie główki plemnika. Należy przypuszczać, że metaboliczna niestabilność DNA może powodować bardzo trudno zauważalne zmiany w kodzie genetycznym DNA starych plemników.

Ostatnio Todorovic i wsp. (61) potwierdzili różnice immunologiczne kompleksu dezoksyrybonukleoproteidowego (DNP) izolowanego ze starych plemników buhaja. Zarówno metodą dyfuzji żelowej jak i immunoelektroforezy stwierdzili wzrost linii precypitacyjnych w DNP zestarzałych plemników. Kompleks ten posiadał również zdecydowanie wyższe miano aglutynacyjne, utrzymujące się na dosyć wysokim poziomie w ciągu 23 dni obserwacji. Pojawienie się w/w różnic immunologicznych wiązać się może wg autorów ze zwiększeniem i wzmocnieniem liczby tzw. wiązań krzyżowych białko-DNA. W wyniku tego zjawiska uszkodzenie mechanizmu syntezy białka, jak również całego metabolizmu w starzejących się plemnikach, może powodować zwiększenie śmiertelności zarodków. Jest to prawdopodobnie także przyczyną otrzymywania nieporównywalnych wyników obserwacji DNA metodą cytofotometrii i mikrospektrofotometrii UV.

#### *Białka zasadowe plemników (zasadowe keratyny)*

O roli białek plemnika, ze względu na trudności w ich izolowaniu, pojawiło się dotychczas stosunkowo niewiele prac. Badania Brill-Petersen i Westenbrinka (8) przeprowadzone z zastosowaniem ekstrakcji liofilizowanych główek plemników buhaja kwasem nadmrowkowym, wykazały obecność w białkach plemnika trzech frakcji różniących się składem aminokwasowym (tab. 6).

Tabela 6

*Zawartość białka we frakcjach I–III i procentowy udział aminokwasów po ekstrakcji z jąder plemników buhaja kwasem nadmrowkowym (wg 8)*

Frakcja	Białko	Aminokwasy %			
		arg	liz	his	1/2 cys
Ogólnie po ekstrakcji kw. nadmrowkowym	100	36	2,3	2,0	6,3
Frakcja I	70	35	0	0	6,3
II	14	2,4	2,6	1,1	4,6
III	7	19	4,5	2,0	4,4

Na podstawie otrzymanych wyników autorzy wysunęli hipotezę, że jądro plemnika jest gąbką zawierającą białka typu histonów-arginino-bogate keratyny. Białka te, być może spełniają podobną rolę co somatyczne histony; wiążą mianowicie najprawdopodobniej reszty fosforanowe DNA. Zbliżone rezultaty otrzymali Berry i Mayer (9) oraz Henricks i Mayer, (31, 32) badając białka plemników knura i buhaja. Ostatnio Coelingh i wsp. (16), stosując jedynie chemiczne rozbitcie błony plemnika przy udziale w mieszaninie ekstrakcyjnej 0,28 M 2-merkaptoetanolu, potwierdzili poprzednio wysunięte wnioski. Otrzymali oni dwie frakcje po sączeniu na żelu Sephadex G-75. Obydwie frakcje w badaniach elektroforetycznych w poliakrylamidzie wędrowały jako pojedyncze pasma, a więc były homogenne. Frakcja II, obejmująca 75% białek, była bardziej bogata w argininę i cysteinę. Szczegółowa analiza tej frakcji wykazała, że N — końcowym aminokwasem jest alanina, a C — końcowym kwas glutaminowy.

Wyżej wymienieni autorzy zaproponowali następujący skład aminokwasów frakcji II: Ala/Arg<sub>24</sub>, Cys<sub>6</sub>, Tre<sub>3</sub>, Tyr<sub>2</sub>, Ser<sub>2</sub>, Gli<sub>2</sub>, Wal<sub>2</sub>, Leu<sub>1</sub>, Ileu<sub>1</sub>, Fen<sub>1</sub>, His<sub>1</sub>/Glu. Daje to ciężar białka w granicach około 6000 (tab. 7). Tak

Tabela 7

*Skład aminokwasowy białek zasadowych plemników buhaja oraz histonu grasicy cielęcej (wartości podane w stosunkach molarnych) (wg 16)*

	Frakcja I	Frakcja II	Histon grasicy cielęcej
Arginina	3,2	23,6	13,1
Cystyna	1,4	5,7	0,4
Treonina	3,4	3,0	5,4
Tyrozyna	1,4	2,0	3,1
Seryna	4,8	2,0	4,6
Walina	3,0	2,0	5,6
Glicyna	3,8	2,1	4,1
Leucyna	2,1	1,0	8,2
Izoleucyna	4,6	1,0	4,6
Alanina	3,9	1,0	8,8
Histydyna	1,3	1,0	2,3
Fenylalanina	1,8	1,0	2,7
Kwas glutaminowy	6,1	1,1	1,9
Kwas asparaginowy	4,3	0,1	5,0
Prolina	3,5	0,1	4,3
Lizyna	3,2	0,1	14,0
Metionina	1,0	0	1,5

więc i ci autorzy wskazują na keratyno-podobne („stable protamine”) białka o dużej zawartości argininy i cysteiny.

Szeroki przegląd białek zasadowych plemników i ich funkcji podał Bloch (10). Ich rola jeszcze do dziś nie jest dokładnie poznana. Przypisuje się im udział w powstawaniu linii opływowej plemnika podczas zagęszczania chromatyny w procesie dojrzewania plemników. Znana jest ich funkcja jako inhibitorów aktywności genów, oraz rola ochronna i stabilizująca genom przed czynnikami otoczenia zarówno w czasie przechowywania nasienia, jak i przy przejściu plemnika przez cytoplazmę jaja. Niewątpliwym jest ich udział w procesie zapłodnienia jaja i we wczesnym rozwoju embrionalnym, mianowicie w stadium gastruli. Białkom zasadowym przypisuje się również kontrolę i zabezpieczenie procesów determinacji płci. Przypuszcza się mianowicie, że na chromosomach płciowych zlokalizowane są geny warunkujące syntezę białek histonowych o składzie niezbędnym dla stabilności tych chromosomów. Umożliwia to zapewne syntezę różnych wariantów histonów plemników u poszczególnych gatunków (10).

Metabolizmowi białek w czasie przekształcania się spermatyd w plemniki poświęcono stosunkowo niewiele prac. Pionierskie badania w tym zakresie prowadzą Gledhill i wsp. (25). Badania te dotyczą zmian cytochemicznych kompleksu DNP w czasie przekształceń okrągłych spermatyd poprzez wydłużone plemniki w normalne plemniki. Autorzy zwracają uwagę na przejście białek histonowych spermatyd w bardziej zasadowe, bogatsze w argininę, białka plemników. Procesowi temu towarzyszy znaczny wzrost siły elektrostatycznej wiązań fosforanowych DNA-białko, zwłaszcza przy przejściu wydłużonych spermatyd w plemniki.

Darżynkiewicz i wsp. (18), badając zależność wiązania  $^3\text{H}$ -aktynomycyny D ( $^3\text{H}$ -AMD) przez DNP buhaja podczas spermiogenezy, stwierdzili progresywny spadek tego wiązania począwszy od okrągłych spermatyd przez wykształcone plemniki do plemników ejakulowanych. Autorzy wykazali, że zagęszczenie jądra plemników (spadek wiązania aktynomycyny) następuje od szczytu akrosomowego i posuwa się ku obwodowi i jednocześnie od partii obwodowych do centrum jądra. Ostatnio Ringertz i wsp. (47) donieśli o stabilizacji takiego kompleksu DNP w przypadku denaturacji cieplnej. Interesujące są badania pracowni Gledhillów odnośnie przebiegu spermiogenezy u buhajów płodnych i niepłodnych. Wyniki tych obserwacji wyraźnie wykazały, że przyczyną niepłodności są zaburzenia w przemianach białek zasadowych w toku spermiogenezy, a nie wyższy lub niższy poziom DNA w plemniku. Reakcja Feulgena w przypadku normalnej spermiogenezy buhajów była wyraźnie zahamowana u buhajów z klinicznie stwierdzoną niepłodnością. Wskazywałoby to na zaburzenia w procesach powstawania wiązań fosforanowych DNA-białko, jak rów-



niez na różnice w składzie tych białek (24). Lavon i wsp. (37) metodami biochemicznymi potwierdzili różnice w składzie aminokwasowym białek zasadowych plemników dojrzewających w trzonie i ogonie najądrzy. Badania frakcji białkowych na poliakrylamidzie wykazały zmiany nie tylko w ich składzie aminokwasowym, ale również w ilości poszczególnych frakcji, zwłaszcza w ogonie najądrzy. Autorzy sugerują także możliwość zmian w trakcie dojrzewania plemników w lipoproteidach błony plemnika. Zagadnienia wyżej wymienione mogą mieć duże znaczenie poznawcze w patologii rozrodu.

### *Białka enzymatyczne plemnika i plazmy nasienia*

W wstawce plemnika zlokalizowany jest stosunkowo duży zestaw enzymów, łącznie z enzymami utleniania komórkowego. Rozwój metod cytochemicznych, a zwłaszcza opartych na redukcji soli tetrazoliowych do farmazanów, dały możliwość wykazania obecności szeregu dehydrogenaz w plemniku. Wykazano ich kilkanaście, między innymi: dehydrogenazę bursztynianową, izocytrynianową, 6-fosfoglukozową, mleczanową, glutaminianową, pirogronianową, 1-fosfoglicerolową, beta-hydroksymasłową (11, 33, 48).

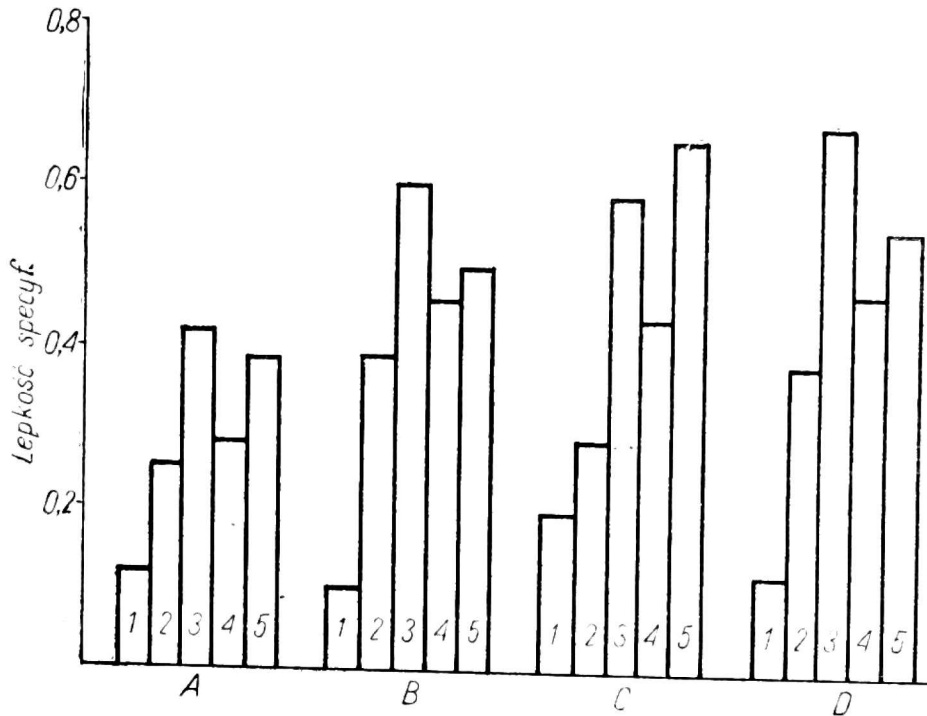
Balton i Linford (12) stwierdzili obecność dehydrogenaz cyklu pentozofosforanowego: dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej oraz 6-fosfoglukonianowej w plemnikach knura. Angelowa (2), stosując metodę cytochemiczną, wykazała obecność w części mitochondrialnej plemników tryka i buhaja — fosfatazy kwaśnej i zasadowej. Ostatnio Dokov i Gerebtzoff (19) podali cytochemiczną metodę lokalizacji izoenzymu LDH-X w plemnikach i w tkance jądrowej zwierząt.

Szczególnie interesujące są badania nad ATPazą plemników. W roku 1958 Burnaszewa (13) wyizolowała z plemników buhaja miozyno-podobne białko, tzw. spermiozynę. Białko to było zdolne tworzyć kompleks z aktywną mięśniową. Już w rok później Tibbs (62) zwrócił uwagę na możliwość istnienia aktynomiozynowego kompleksu we włóknie plemnika, na podstawie wyraźnej aktywacji tego kompleksu jonami  $Mg^{++}$ , które jak wiadomo aktywują mięśniową aktyno-miozynową ATPazę, a hamują miozynową. Gibbons (26) i Mohri (42) potwierdzili aktywność stymulowanej przez jony  $Mg^{++}$  i  $Ca^{++}$  ATPazy, ekstrahowanej z białek rząsek i wittek ryb.

Szerokie badania odnośnie ATPazy plemników ssaków przeprowadzili Young i Nelson (68) poprzez wiskozymetryczne analizy izolowanych białek witki plemnika. Autorzy ci stwierdzili tzw. flaktynospermiozynowy kompleks, przy czym flaktyna wykazywała duże podobieństwo do aktyny mięśniowej. Zarówno pomiary lepkości flaktospermiozyny i aktynomio-

zyny w obecności 0,5 mM ATP i 0,1 M  $MgCl_2$ , jak i obserwacje wpływu jonów  $Mg^{++}$  na lepkość białek wyraźnie wskazywały na duże podobieństwo tych kompleksów. Kompleks flaktynospermiozynowy wykazywał precypitację przy spadku stężenia 0,5 M KCl, jak również reakcję superprecypitacji przy wzroście stężenia ATP do 0,5 mM.

Podobieństwo między białkami kurczliwymi witki plemnika i włókna mięśniowego wykazano poprzez formowanie różnych kompleksów (rys. 1).



Rys. 1. Kompleksy białek kurczliwych izolowanych z witek plemników buhaja i mięśnia szkieletowego szczura (wg 68)

Kolumna 1: 1,8 ml próbki aktywnej lub flaktyny w 6,7 mM buforze fosforanowym, pH = 7,0, zawierającym 0,05 mM ATP, 0,1 M  $MgCl_2$  i 0,1 M KCl.

Kolumna 2: 1,8 ml próbki miozyny lub spermiozyny w 0,5 M KCl, pH = 7,0

Kolumna 3: 1,8 ml próbki aktynomiozyny, flaktynomiozyny, flaktospermiozyny i aktynomiozyny

Kolumna 4: 5—7 minut po dodaniu 0,2 ml 5 mM ATP w 1 mM  $MgCl_2$  do kompleksu białkowego z kolumny 3

Kolumna 5: 30 minut po dodaniu w.w. mieszaniny.  
Stężenia białek: A — aktyna 0,3 mg/ml, spermiozyna 0,9 mg/ml, aktospermiozyna 1,2 mg/ml

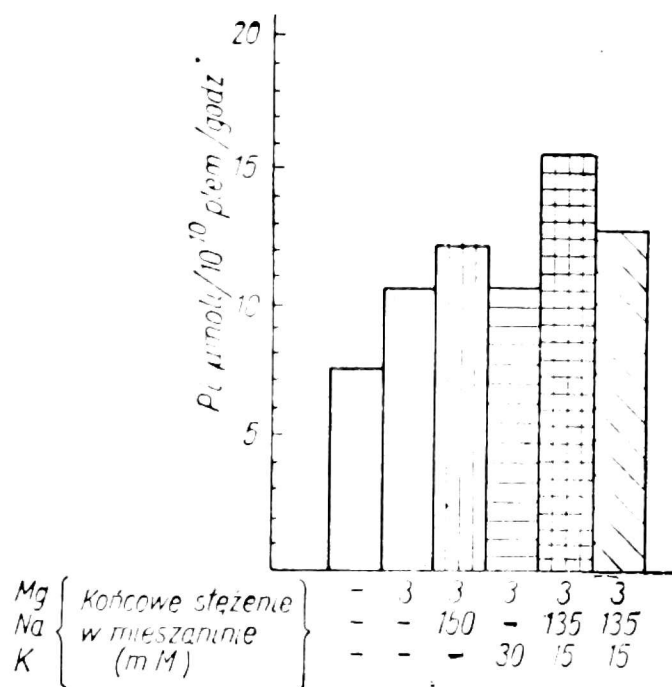
B — flaktyna 0,5 mg/ml, miozyna 1,5 mg/ml, flaktomiozyna 2,0 mg/ml

C — flaktyna 0,6 mg/ml, spermiozyna 1,2 mg/ml, flaktospermiozyna 1,8 mg/ml

D — aktyna 0,4 mg/ml, miozyna 1,2 mg/ml, aktomiozyna 1,6 mg/ml

We wszystkich kombinacjach A, B, C, D specyficzne lepkości były wyższe aniżeli poszczególnych komponentów. Dodanie ATP powodowało początkowo spadek lepkości a następnie powolny jej wzrost po 30 minutach. Doświadczenia te wskazują na podobieństwo flaktyny do F-aktyny mięśnia, jak również całych kompleksów aktynomiozynowego i flaktospermiozynowego. Można wnioskować, że oba białka kurczliwe witki plemnika, spermiozyna i flaktyna umożliwiają ruch plemnika. Współdziałanie tych białek jest podobne do współdziałania białek kurczliwych mięśnia poprzecznie prążkowanego.

Inny typ ATPazy, zależnej od jonów  $Mg^{++}$  a stymulowanej przez jony  $Na^+$  i  $K^+$  stwierdzili Shiro Uesugi i wsp. (59) w całych plemnikach uzyskanych z najądźra knura.



Rys. 2. Aktywność ATPazy plemników najądźra knura (wg 59). Mieszanina inkubacyjna: 3 mM ATP, różne stężenia kationów, 35 mM TRIS — HCl bufor (pH = 7,4)

Niektóre właściwości tego enzymu przedstawia rys. 2. Najwyższą aktywność enzymu stwierdzono w obecności wszystkich trzech jonów. Natomiast jony  $K^+$  w obecności jonów  $Mg^{++}$  nie powodowały wzrostu aktywności ATPazy. Po ultrasonicznym rozbiciu plemników i następnym różnicowym wirowaniu uzyskano obok główek i witek dwie frakcje, które posiadały ATPazę również zależną od jonów  $Mg^{++}$  i stymulowaną przez jony  $Na^+$  i  $K^+$  (tab. 8).

Tabela 8

Aktywność ATP-azy rozbitych plemników z najądrzy knura (wg 59)  
Pi/ $\mu$ moli/N mg/godz.

Części plemnika	Mg	Mg + Na + K	Mg + Na + K/Mg
Główka	2,07	2,12	1,02
Witka	17,72	18,90	1,07
Frakcja 1	5,53	6,90	1,25
Frakcja 2	6,68	8,70	1,30

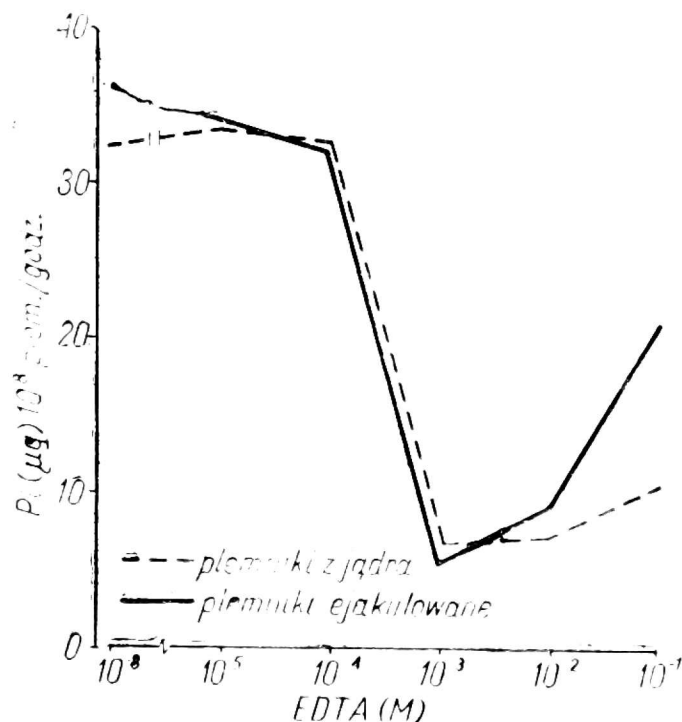
Mieszanina inkubacyjna: 3 mM ATP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 105 mM NaCl, 30 mM KCl,  
35 mM Tris-HCl bufor pH = 7,4

Może to wskazywać na obecność w plemnikach zwierząt ATPazy zlokalizowanej na błonach mitochondrialnych i w frakcji mikrosomalnej, odgrywającej rolę w enzymatycznym mechanizmie aktywnego transportu jonów poprzez błonę mitochondrialną plemników. Podobny typ ATPazy stwierdzili ostatnio Quinn i White (46) w plemnikach tryka i buhaja.

Natomiast Voglmayer i wsp. (64) porównywali aktywność ATPazy plemników tryka otrzymanych z jąder i ejakulatu. Autorzy ci stwierdzili ATPazę zależną od jonów Mg<sup>++</sup> a stymulowaną przez jony Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> w obu typach plemników. Wyższą aktywność posiadały jednak plemniki z ejakulatu, mimo że plemniki z jąder zawierały o około 50% więcej białka. Optimum działania ATPazy plemników z jąder przypada na pH = 8,1, zaś ATPazy plemników ejakulowanych na pH = 6,7. Przy pH = 8,6 jony Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> hamowały aktywność ATPazy.

Inkubując oba typy plemników w różnych stężeniach EDTA (wersjan dwusodowy), stwierdzono zmniejszoną aktywność ATPazy przy stężeniu 10<sup>-3</sup> M EDTA (rys. 3); w obecności 10<sup>-3</sup> M CaCl<sub>2</sub> aktywność ATPazy obniżała się o 80%. W miarę wzrostu stężenia EDTA aktywność ATPazy wzrastała szczególnie w przypadku plemników z ejakulatu. Uzyskane wyniki autorzy tłumaczą chelatującymi właściwościami EDTA. Jony Ca<sup>++</sup> w pH = 8,2 podwyższały wyraźnie aktywność plemników ejakulatu, lecz nie miały żadnego wpływu na plemniki uzyskane z jąder. Wskazywać to może również na to, że powinowactwo ATPazy plemnika do jonów Ca<sup>++</sup> wzrasta podczas ich dojrzewania w najądrzu. Można również wnioskować, że plemniki z jąder posiadają nierozwinięty mechanizm koordynacji ruchu witki.

Z innych enzymów plemnika należy wymienić glicerokinazę, opisaną obszernie przez Mohri i Masaki (40). Enzym ten metabolizujący glicerol okazał się w swoich właściwościach biochemicznych podobny do gli-



Rys. 3. Wpływ EDTA na poziom hydrolizy ATP przez plemniki z jąder i ejakulowane w obecności  $10^{-3}$  M  $\text{CaCl}_2$  (wg 64)

cerokinazy wątroby. Obecny w plemnikach, w mitochondrialnej części wstawki, posiada optimum działania przy  $\text{pH} = 10$ .

Ponieważ aktywność dehydrogenazy glicerynianowej plemników jest zależna od NAD i NADP (41), powstały dzięki glicerokinazie L-glicero-3 fosforan może być utleniany do dwuhydroksyacetonu i metabolizowany w ciągu glikolitycznym. Aktywność glicerokinazy w plemnikach jest różna u poszczególnych gatunków. W plazmie nasienia albo jest niska albo nie występuje (tab. 9).

Tabela 9

Glicerokinaza w pełnym nasieniu, plemnikach i plazmie nasienia różnych gatunków zwierząt domowych (wg 40)

Gatunek	Aktywność jedn/mg białka *		
	nasienie	plazma	plemniki
Buhaj	$0,03 \pm 0,02$	0	$0,81 \pm 0,20$
Tryk	$0,17 \pm 0,04$	0	$0,95 \pm 0,17$
Knur	—	$0,09 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,08$
Królik	—	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
Kogut	—	$0,02 \pm 0,02$	$2,44 \pm 0,42$

\* 1 jednostka odpowiada  $0,1 \mu\text{mola}$  L-glicero-3-fosforanu uformowanego w ciągu 1 godz. inkubacji.



Na uwagę zasługuje wysoka aktywność tego enzymu w plemnikach koguta, prawie 3-krotnie wyższa niż u buhaja i tryka. Mohri i Masaki wskazują na możliwość metabolizowania glicerolu powstałego z przemian fosfolipidów, między innymi plazmalogenu cholinowego, występujących w dużych ilościach zwłaszcza u tryka i buhaja. W nasieniu normalnym glicerol nie występuje. Jednak w wyniku przemiany fosfolipidów w plazmie nasienia obecne są duże ilości glicerofosfocholiny, która może być metabolizowana w drogach rodnych samicy przy udziale diesteraz. Powstały przy udziale glicerokinazy L-glicero-3-fosforan może stanowić źródło energii dla plemników podczas ich wędrówki w drogach rodnych samicy. Nie bez znaczenia jest również obecność glicerolu w stosowanych obecnie rozcieńczalnikach nasienia. Różnice w aktywnościach glicerokinazy plemników różnych gatunków zwierząt mogą korelować z przydatnością ich nasienia do zamrażania. Tak więc obok dehydrogenazy sorbitolowej umożliwiającej przekształcanie sorbitolu u tryka, jeszcze jeden alkohol — glicerol może ulegać przemianom.

Nie chcąc zbyt rozszerzać przeglądu piśmiennictwa, nie zatrzymujemy się na omawianiu właściwości biochemicznych enzymu dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Obszerne prace w tej dziedzinie wykonał zwłaszcza Clausen (17), które dają możliwie pełną charakterystykę tego enzymu. Interesujące wyniki dotyczące zmian rozwojowych izoenzymów LDH-X i glukozo-6-dehydrogenazy w jądrach szczura opublikowali ostatnio Blackshaw i Elington (14). Stwierdzili oni, że pomiędzy 20 a 30 dniem życia pojawiają się dwa izoenzymy LDH-X<sub>1</sub> i LDH-X<sub>2</sub>. Ich specyficzna aktywność wzrastała w miarę proliferacji komórek kanalików nasieniotwórczych jądra i pojawienia się spermatocytów I rzędu (tab. 10). Komórki śródmiąższowe jądra posiadały również aktywność obu izoenzymów. Aktywność ich występowała około 10 dni wcześniej aniżeli 6-fosfo-glukozodehydrogenazy.

Tabela 10

*Wpływ wieku na aktywność C-podjednostek LDH jądra szczura (wg 14)*

Wiek dni	Aktywność		
	na 1 mg białka x 10 <sup>-1</sup>	na 1 g jądra x 10 <sup>-3</sup>	na jądro x 10 <sup>-3</sup>
20	0,0	0,0	0,0
30	33,9	43,1	23,2
40	47,4	60,1	58,9
50	42,0	55,8	69,6
60	55,7	42,4	45,7
70	53,4	46,4	102,0

Wiele enzymów stwierdzonych w plemnikach występuje w plazmie nasienia. Interesujące prace na ten temat przedstawili Murdoch i White (43). Badali oni aktywność następujących enzymów: amylazy, dehydrogenazy bursztynianowej (SDH), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), transaminazy asparaginianowej (GOT), kwaśnej i zasadowej fosfatazy, dehydrogenazy-6-fosfoglukozowej (GDH) w plemnikach i wydzielinach gruczołów dodatkowych tryka, buhaja, psa i królika. Aktywność tych enzymów przedstawia tab. 11.

Tabela 11

*Aktywność enzymów w plemnikach i plazmie nasiennej tryka i buhaja (wg 43)*

Gatunek	Próby	Amylaza	SDH	LDH	GDH	GOT	10 <sup>4</sup> x kwaśna fosfat.	zasadowa fosfataza x 10 <sup>4</sup>
Tryk	Plazma	0	śląd	4143	10,9	491	170	3780
	Plemniki	0	865	66371	323	335	810	1790
Buhaj	Plazma	0,027	śląd	1736	0	493	700	1990
	Plemniki	0,096	244	41068	0	1133	980	2630

Stosowane jednostki przy oznaczaniu poszczególnych enzymów:  
 amylaza — hydroliza 0,1 ml substratu przez 0,2 mg amylazy w ciągu 15 min. przy pH = 7,0 w 310°K  
 SDH — µg formazanu utworzonego w ciągu 20 min. w 310°K  
 LDH — jednostek Wróblewskiego  
 GDH — jednostek Wróblewskiego  
 GOT — jednostek Reitmana i Frankela  
 Fosfatazy — ilość enzymu zawarta w 1000 ml próbki uwalniającej 1 mM p-nitrofenolu w 310°K

Na uwagę zasługuje całkowity brak aktywności amylazy w nasieniu tryka oraz GDH w nasieniu buhaja, u tryka aktywność SDH, LDH, fosfatazy kwaśnej i GDH były znacznie wyższe w plemnikach niż w plazmie. U buhaja najwyższą aktywność zaobserwowano w przypadku GOT, LDH oraz fosfatazy zasadowej w plemnikach. Badając aktywności tych enzymów w płynach uzyskanych z jąder, najądrzy i pęcherzyków nasiennych tryka autorzy stwierdzili niskie wartości aktywności LDH, GOT, kwaśnej i zasadowej fosfatazy w płynie jądrowym. Płyn najądrza posiadał wysokie aktywności LDH, kwaśnej i zasadowej fosfatazy, zaś pęcherzyki nasienne — GOT i GDH. Roussel i Stallcup (49, 50) oraz Eliasson (21) stwierdzili istotne zależności między aktywnością zasadowej fosfatazy,

LDH i GOT nasienia buhaja a procentem zacieleń u krów. Z innych enzymów plazmy nasienia na uwagę zasługuje 5'-nukleotydaza. W ostatnim okresie wzrosło zainteresowanie tym enzymem ze względu na rolę jaką prawdopodobnie spełnia w metabolizmie kwasów nukleinowych i nukleotydów nasienia. Według Heppela i Hilmoie (34) izolowany enzym z plazmy nasienia buhaja jest aktywowany przez jony  $Mg^{++}$ , zaś optimum działania przypada przy  $pH = 8,5$ . Natomiast Levin i Bodansky (38) wykazali dla 5'-nukleotydazy dwa optima  $pH : 9,3 - 9,5$  w obecności jonów  $Mg^{++}$  oraz  $7,5 - 8,0$  przy braku tych jonów. Strzeżek i Wołos (55) stwierdzili, że 5'-nukleotydaza plazmy nasienia tryka jest również aktywowana jonami  $Mg^{++}$  (optymalne stężenie 1 mM). Posiada ona dwa optima  $pH$ , jedno przy  $pH = 8,4 - 8,9$ , zaś drugie przy  $pH 9,6 - 9,8$ . Optima te występują w obecności jonów  $Mg^{++}$  jak i w przypadku ich braku. Wskazuje to na obecność dwóch izoenzymów 5'-nukleotydazy plazmy nasienia tryka. Dla 5'-nukleotydazy tryka wartość  $K_m = 3,25 \times 10^{-4}$  M. Enzym jest białkiem o ciężarze molekularnym około 110 tys. Największe powinowactwo wykazuje do 5' - AMP, 5' - dAMP, 5' - GMP oraz 5' - UMP, najmniejsze do 5' - TMP, niewiele większe niż do 3'-nukleotydów. Buruiana i Dema (15) wyizolowali z plazmy nasienia buhaja dwa typy 5'-nukleotydazy. Typ A, najbardziej rozpowszechniony w plazmie nasienia normalnego, wykazywał wzrost aktywności w miarę podnoszenia stężenia substratu do 3—4  $\mu$ moli, posiadał  $K_m = 0,5 \times 10^{-6}$  M. Typ B, pojawiający się tylko w plazmie nasienia osobników nieplodnych, wykazywał wzrost aktywności do stężenia substratu 12  $\mu$ moli i posiadał  $K_m = 0,5 \times 10^{-5}$  M. Autorzy wiążą aktywność 5'-nukleotydazy z intensywnością biosyntezy kwasów nukleinowych podczas spermatogenezy. W przypadku większego powinowactwa enzymu do mononukleotydów puli metabolicznej, maleje intensywność biosyntezy kwasów nukleinowych. Ostatnio Strzeżek i Wołos (dane niepublikowane) stwierdzili wyraźnie niższą aktywność 5'-nukleotydazy w przypadku patologicznego nasienia tryka i buhaja.

#### *Udział kwasu sjałowego w procesie rozmnażania zwierząt*

Rola jaką pełnią kwasy sjałowe (N-acetylowe i N-glikolilowe pochodne kwasu neuraminowego) w procesach rozmnażania zwierząt jest jeszcze stosunkowo mało poznana. Przypisuje się im właściwie dwie funkcje: 1) udział w tworzeniu ujemnego ładunku elektrostatycznego na powierzchni plemników, 2) udział w procesie zapłodnienia komórki jajowej. Nasienie zwierząt gospodarskich zawiera, głównie w plazmie nasienia, kwas N-acetyloneuraminowy (NANA) w odróżnieniu od surowicy krwi zwierząt, gdzie u jednych gatunków przeważa kwas N-glikoliloneuraminowy (NGNA), zaś u innych NANA. Strzeżek i Kiczew (56) stwierdzili

w plazmie nasienia tryka średnio 147,6 mg<sup>0</sup>%, zaś u buhaja 234,3 mg<sup>0</sup>% kwasu sjałowego. Zawartość jego w nasieniu różnych gatunków zwierząt wykazuje stosunkowo duże wahania (27). Wydzielany głównie przez pęcherzyki nasienne, najądrza i jądro znajduje się pod kontrolą hormonalną hormonów płciowych (51). Może być równocześnie jednym ze wskaźników stanu czynnościowego układu rozrodczego i jakości nasienia (65).

Plemniki zawierają około 0,59% kwasu sjałowego w stosunku do nasienia jako całości i to skupionego głównie w części akrosomowej (27, 35). Fuhrman i wsp. (22) wskazali na udział kwasu sjałowego w tworzeniu ujemnego ładunku na powierzchni plemników buhaja. Po traktowaniu plemnika neuraminidazą uwalniane było średnio  $6,2 \times 10^{-8} \times 2,3$  mg kwasu sjałowego. Elektroforetyczna ruchliwość plemników z najądrzy różniła się o około 20% w porównaniu z plemnikami ejakulatu. Punkt izoelektryczny plemników z najądrzy wynosił  $\text{pH} = 3,9$ , zaś ejakulowanych około 4,7—4,8. Ładunek plemników ejakulowanych obniżał się po oddzieleniu plazmy i powracał do stanu wyjściowego po ponownym połączeniu plazmy i plemników. Wskazuje to, że zmiany ładunku plemników mogły być powodowane absorpcją elektrostatycznie dodatnio naładowanych składników plazmy, oraz że kwas sjałowy jest trwale związany z błoną komórkową plemnika. Nevo i wsp. (44) zaobserwowali, że witka plemników buhaja posiada wyższy ujemny ładunek niż główka.

Potwierdzono również obecność kwasu sjałowego w składzie glikoproteidów osłonek komórki jajowej. Soupart i wsp. (60) podali, że traktowanie *zona pellucida* neuraminidazą powoduje uwolnienie kwasu sjałowego i obniża procent penetracji plemnika do komórki jajowej. Według autorów jest to wynik obniżenia elastyczności osłonki. Na powiązanie kwasu sjałowego z procesami zapłodnienia komórki jajowej zwrócili uwagę Dukelow i wsp. (20). Dodanie kwasu sjałowego do zawiesiny plemników kapacytowanych (po okresie inkubacji w macicy) w obecności czynnika dekapacytacji z plazmy nasienia (DF) powodowało niezapłodnienie komórki jajowej. Przyczyną tego zjawiska według autorów mogło być silne wiązanie czynnika dekapacytacji z powierzchnią błony komórkowej plemnika przy czynnym udziale kwasu sjałowego. Podobną rolę może odgrywać silnie związany z glikoproteidami plemnika kwas sjałowy.

Duże zainteresowanie budzi zagadnienie przemian glikoproteidów w czasie przechowywania nasienia, a zwłaszcza zachowanie się kwasu sjałowego. Prace Uspienskiego (63), Strzeżka i Kiczewa (56) oraz Strzeżka (57, 60) wyraźnie wskazują na nagromadzenie się kwasu sjałowego w czasie ekwilibracji rozcieńczonego nasienia (u tryka wzrost o 30%, zaś u buhaja o 12%). Przypuszczalnie tak znaczne nagromadzenie się kwasu sjałowego następuje pod wpływem działania enzymów proteolitycznych akro-



somów plemników na glikoproteidy żółtka jaja rozcieńczalnika oraz plazmy nasienia.

Powodować to może nagromadzenie się amoniaku w przechowywanym nasieniu na skutek procesów dezaminacji kwasu sjałowego. Wynikiem tych zjawisk może być zmiana ładunku elektrostatycznego na powierzchni błony plemnika i nagromadzenie się dodatnio naładowanych składników plazmy nasienia. Ponieważ reakcje enzymatyczne są bardziej nasilone w nasieniu tryka, może to być jedną z przyczyn obniżonej zdolności zapładniającej nasienia przechowywanego, przy zachowanych prawidłowych wskaźnikach jakości nasienia. Zagadnienia te wymagają dalszych potwierdzeń.

#### LITERATURA

1. Allison A.C., Hartree E.F.: *J. Reprod. Fert.* 21, 501, 1970.
2. Angelowa Z., *Wet.-med. nauki*, 9, 81, 1967.
3. Bertil A., Matgot G.: *Acta Physiol. Scand.*, 66, 106, 1966.
4. Bratanow K., Josifow K., Matliewa M., Cekowa E.: *Wet.-med. nauki*, 8, 73, 1964.
5. Bouters E.: *Meded. Veert. Rijhsuniv. Gent.* 10, 35, 1966.
6. Borenfreund E., Fitt E., Bendich A.: *Nature*, 191, 1375, 1961.
7. Bouters R., Esnault C., Salisbury G. W., Ortavant R.: *J. Reprod. Fert.* 14, 355, 1967.
8. Bril-Petersen E., Westenbrink H. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 76, 152, 1963.
9. Berry R.E., Mayer D.T.: *Expl. Cell Res.*, 18, 398, 1959.
10. Bloch D.: *Genetics*, 61, 93, 1969.
11. Balogh K., Cohen R.B.: *Fert. Ster.*, 15, 35, 1964.
12. Balton A.E., Linford E.: *J. Reprod. Fert.*, 21, 353, 1970.
13. Burnaszewa S.A.: *Biochimija* 23, 558, 1958.
14. Blackshaw A.W., Elington J.S.H.: *J. Reprod. Fert.*, 22, 69, 1970.
15. Buruiana L.M., Dema A.: *Revue romaine de bioch.* 5 91, 1968.
16. Coeligh J.P., Rozijn T.H., Manfoort C.H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 188, 353, 1969.
17. Clausen J.: *Biochem. J.*, 111, 207, 1969.
18. Darżynkiewicz Z., Gledhill B.L., Ringertz N.R.: *Exptl. Cell Res.*, 58, 435, 1969.
19. Dokow W., Gerebtzoff M.A.: *Compets r.s. Soc. Biol.* 1964, 672, 1970.
20. Dukelow W.R., Chernoff H.N., Williams W.L.: *J. Reprod. Fert.* 14, 393, 1967.
21. Eliasson R.: *J. Reprod. Fert.*, 11, 281, 1966.
22. Fuhrman G.F., Granzer E., Bey E., Ruhestroth-Bauer G.: *Z. Naturforsch.* 18b, 236, 1963.
23. Graves C.N., Salisbury G.W.: *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 22, 569, 1963.
24. Gledhill B.L.: *Acta vet. scand.* 7, 1—20, 131—142, 166—174, 1966.
25. Gledhill B.L., Gledhill M.P., Rigler R., Ringertz N.R.: *Exptl. Cell Res.* 41, 652, 1966.
26. Gibbons J.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50, 1002, 1963.
27. Hartree E.F., Srivastava P.N.: *J. Reprod. Fert.*, 9, 47, 1965.



28. Hartree E.F., Mann T.: *J. Reprod. Fert.*, 1, 23, 1960.
29. Hart R.G., Salisbury G.W.: *Fed. Proc. Fed. Amer. Exp. Biol.* 26, 645, 1967.
30. Hart R.G.: *Biology of Reprod., Suppl.* 2, 8, 1970.
31. Henricks D.M., Mayer D.T.: *Expl. Cell Res.*, 40, 402, 1965.
32. Henricks D.M., Mayer D.T.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119, 769, 1965.
33. Hikawa O., Ogura Y., Sugawa A.: *Bull. Nat. Inst. Anim. Health.*, 37, 127, 1959.
34. Heppel L.A., Hilmoe R.J.: *J. Biol. Chem.*, 188, 655, 1951.
35. Hudson M.T., Wellerson R., Kupfferberg A.B.: *J. Reprod. Fert.*, 9, 189, 1965.
36. Leuchtenberger C., Leuchtenberger B.: *Biochem. Pharm.* 14, 128, 1960.
37. Lavon V., Volcani R., Danon D.: *J. Reprod. Fert.*, 23, 215, 1970.
38. Levin S.J., Bodansky D.: *J. Biol. Chem.*, 241, 51, 1966.
39. Meyhöfer W.: *Archiv. Klin. Exp. Derm.* 216, 556, 1963.
40. Mohri H., Masaki J.: *J. Reprod. Fert.* 14, 179, 1967.
41. Mohri H., Mohri T., Ernster L.: *Expl. Cell Res.*, 38, 217, 1965.
42. Mohri H.: *Biol. Bull.* 127, 381, 1964.
43. Murdoch R.N., White J.G.: *Aust. J. Biol. Sci.* 21, 3, 1968.
44. Nevo A.C., Michaeli J., Shindler H.: *Exptl. Cell. Res.* 23, 69, 1961.
45. Parez M., Petel J.P., Vendrely C.: *C.R. Acad. Sci (Paris)*, 251, 2581, 1960.
46. Quinn P.J., White J.G.: *J. Reprod. Fert.*, 15, 449, 1969.
47. Ringertz N.R., Gledhill B.L., Darżynkiewicz Z.: *Exptl. Cell. Res.* 62, 204, 1970.
48. Reisenweber A., Nelson L.: *Naturwissenschaften* 53, 133, 1966.
49. Roussel J.D., Stallcup O.T.: *Intent. J. Fert.* 11, 322, 1966.
50. Roussel J.D., Stallcup O.T.: *J. Dairy Sci.* 48, 841, 1965.
51. Rajalakshimi M., Prasad M.R.: *J. Reprod. Fert.*, 24, 409, 1971.
52. Srivastava P.N., Adams C.E., Hartree E.F.: *J. Reprod. Fert.* 10, 61, 1965.
53. Srivastava P.N., Zaneveld L.J., Williams W.L.: *Bioch. biophys. Res. Commun.*, 39, 575, 1970.
54. Strzeżek J.: *Med. wet.* 9, 552, 1970.
55. Strzeżek J., Wołos A.: *Mat. IX Zjazdu P.T. Bioch. Zabrze*, 1971.
56. Strzeżek J., Kiczew G.: *Med.-wet. nauki*, Sofia, 1971 (w druku).
57. Strzeżek J.: *Comptes. rd. l'academie Sci. agri. Bulgarien*, 2, 1971.
58. Salisbury G.W., Lodge J.R., Baker F.N.: *J. Dairy Sci.*, 47, 165, 1964.
59. Shiro Uesugi, Saburo Yamazoe: *Nature*, 209, 403, 1966.
60. Soupert M.D., Thomas H., Clewe M.D.: *Fert. Ster.* 16, 677, 1965.
61. Todorovic R.A., Graves C.N., Salisbury G.W.: *J. Dairy Sci.* 52, 1415, 1969.
62. Tibbs J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 33, 220, 1959.
63. Uspienskiy A.H.: *Owcewodstwo*, 9, 34, 1969.
64. Volmayr J.P., White J.G., Quinn P.J.: *Biol. Reprod.*, 1, 121, 1969.
65. Warren L.: *J. Clin. Invest.* 38, 755, 1959.
66. Zaneveld L.J., Srivastava P.N., Williams W.L.: *J. Reprod. Fert.* 20, 337, 1969.
67. Zaneveld L.J., Srivastava P.N., Williams W.L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 133, 1172, 1970.
68. Young L.G., Nelson L.: *Exptl. Cell Res.* 51, 34, 1968.