

TADEUSZ CZAPLAK

### ZNACZENIE NIEKTÓRYCH CZYNNIKÓW W PROCESIE ZAPŁODNIENIA

Dokładna znajomość wszelkich procesów związanych z procesami rozrodu u zwierząt jest konieczna dla prowadzenia skutecznej walki z niepłodnością, powodującą znaczne straty w produkcji zwierzęcej. Proces zapłodnienia czyli wzajemnej asymilacji komórki rozrodczej żeńskiej z komórką rozrodczą męską stwarzający w efekcie nowy twór — zygotę czy zarodek nowego organizmu, jest procesem decydującym w całym zagadnieniu płodności. Nic też dziwnego, że mechanika procesu zapłodnienia jest tematem tak wielkiego zainteresowania. Obok badań nad działalnością niektórych hormonów w procesach płciowych prowadzone są badania nad wykrywaniem i działaniem szeregu enzymów.

Jak wiadomo enzymy, albo raczej fermenty są to substancje białkowe, produkowane przez żywą komórkę spełniające rolę katalizatorów w przemianach i w związanych z tymi procesami przemianach energii. Poszczególne enzymy dostosowane są do przekształcania ściśle określonych związków chemicznych, które ogólnie nazywamy substratami enzymów. W niniejszym referacie zostanie omówiona rola i znaczenie enzymów: hyaluronidazy i mucynazy w procesach zapłodnienia. Nazwy tych enzymów, szczególnie zaś pierwszego, często spotykane są w aktualnej literaturze zootechnicznej. Warto więc zebrać i uporządkować wiadomości ich dotyczącej.

Zacznijmy od klasyfikacji: Obydwa wyżej wymienione fermenty należą do grupy fermentów zwanych — liazami (enzymy rozkładające podłoże na związki prostsze), następnie w ramach tej grupy do typu tzw. hydrolaz (fermenty powodujące rozkład podłoża na prostsze związki przy udziale cząsteczki wody) i do podtypu karbohydraz (enzymy rozczepiające wiązania glikozydowe). Gdyby chcieć jeszcze ściślej sklasyfikować hyaluronidazę i mucynazę, to należałoby je zaliczyć do polisacharazów czyli enzymów należących do karbohydraz, ale rozkładających tylko duże cząsteczki wielocukrowców (w odróżnieniu od tzw. oligosacharaz rozkładających tylko kilkocukrowce lub proste glikozydy).

Hyaluronidaza jest enzymem rozkładającym kwas hyaluronowy (będący w tym wypadku substratem działania enzymu), na acetyloglikozaminę i kwas glikoronowy. Kwas hyaluronowy jest wielocukrowcem cechującym się dużą masą cząsteczkową, zbudowanym z dwóch wyżej wymienionych związków. Dane cyfrowe dotyczące masy cząsteczkowej tego związku są dosyć rozbieżne, przede wszystkim dlatego, że kwas hyaluronowy łatwo ulega depolimeryzacji przy zabiegach mających na celu jego izolowanie i oczyszczanie (Blix, Halm). W stanie rodzimym roztwory kwasu hyaluronowego okazują dużą lepkość, która maleje w miarę rozpadu kwasu na produkty prostsze. Dotychczas wyizolowano kwas hyaluronowy z ciążka szklistego oka, z galarety zawartej w pepowinie, z mazi turebek stawowych i ze skóry. Stwierdzono również, że kwas hyaluronowy zawarty jest w warstwie galaretowatych komórek follikularnych otaczających komórki jajową po wypadnięciu jej z pękniętego pęcherzyka Graafa. Kwas hyaluronowy nadaje właśnie tej warstwie komórek otaczającej jajo lepkość i charakter śluzowaty.

Rozproszenia tej zbitej warstwy śluzu dokonuje enzym hyaluronidaza zawarty w spermie samców. Rozproszenie to natępuje na skutek rozpuszczenia przez hyaluronidazę kwasu hyaluronowego, stanowiącego lepiszcze warstwy komórek. Dzięki działalności więc hyaluronidazy plemniki samca mogą przedostać się poprzez warstwę komórek otaczających jajo do jego powierzchni. Jak się następnie okazało hyaluronidaza działa również i na błonę otaczającą komórkę jajową czyniąc ją przepuszczalną dla plemników.

Rozkład kwasu hyaluronowego przebiega w sposób

fazowy. Najpierw następuje tylko depolimeryzacja dużych cząsteczek kwasu hyaluronowego, dających roztwory o wybitnej lepkości, na nieredukujące prostsze wielocukrowce. Późniejsze stadia hydrolizy doprowadzają dopiero do powstania redukujących najprostszych produktów (kwas glikuronowy i acetyloglikozamina). Prawdopodobnie te dwie fazy rozkładu kwasu hyaluronowego katalizowane są przez dwa odmienne enzymy. Hahn, który otrzymał bardzo czyste preparaty hyaluronidazy z jąder byka, oddzielił od siebie oba enzymy, wchodzące w skład hyaluronidazy i nazwał je mukopolisacharydazą i mukooligosacharydazą. Początkowo wyosobniono hyaluronidazę z jąder samców i stąd powstało mniemanie, że jądra są źródłem tego enzymu. Późniejsze jednak badania, szczególnie badaczy radzieckich (Sokołowska, Gierasimowa, Kiedrow, Szergin) jak i innych (Mc Clean, Chain) wykazały, że same plemniki wydzielają również hyaluronidazę. Aby rozkład kwasu hyaluronowego przebiegał dostatecznie szybko, konieczna jest pewna koncentracja enzymu rozkładającego. Stąd wypływa wniosek, że dla skuteczności procesu zapłodnienia potrzebna jest większa ilość plemników, czyli większa ilość spermy. Okazuje się więc, że nie jeden plemnik bierze czynny udział w zapłodnieniu ale, że czynny współudział biorą wszystkie plemniki, które dotarły do jaja. Mało tego, okazuje się, że nawet te plemniki, które nie dotarły do jaja są absorbowane przez macicę i wywierają później wpływ na rozwój płodu. Każdy więc proces zapłodnienia wymaga pewnego optimum ilości spermy i zawartych w niej plemników. Zagadnienie to ma szczególne znaczenie przy sztucznej inseminacji.

Szereg doświadczeń przeprowadzonych przez badaczy radzieckich (głównie przez Miłowanowa i Sokołowską) wykazało, że hyaluronidaza nie jest swoista dla poszczególnych gatunków zwierząt. Hyaluronidaza obcego gatunku tak samo rozprasza komórki follikularne jak hyaluronidaza kopulującego samca. Na tej własności opiera się metoda mieszania nasienia z nasieniem gatunkowo odmiennym w celu zwiększenia zapłodniwalności, w przypadku, gdy liczba plemników jest znikomo mała. Korzystne działania na płodność i plenność przez krycie macior dwoma knurami polegają między innymi również i na zwiększonym działaniu hyaluronidazy. Aby działanie hyaluronidazy było skuteczne, konieczny jest, obok odpowiedniego stężenia enzymu, również odpowiedni odczyn (pH) środowiska działania. Optymalne pH dla działania hyaluronidazy waha się między 5.0 a 6.8. Odczyn środowiska, w którym działa hyaluronidaza zależna jest między innymi od odczynu spermy. Sperma o odczynie zbyt kwaśnym w zasadzie hamuje działanie hyaluronidazy i tym samym zmniejsza zapłodniwalność nasienia.

W związku ze stwierdzonym wpływem hyaluronidazy na proces zapłodnienia przeprowadzonych zostało szereg badań nad tym enzymem. Badania te dotyczyły w pierwszym rzędzie stwierdzenia obecności i oznaczenia aktywności hyaluronidazy w nasieniu różnych zwierząt. Dziś znanych jest kilka metod wykrywania i oznaczenia aktywności hyaluronidazy, a mianowicie:

- 1) na podstawie działania hyaluronidazy bezpośrednio na osłonkę jaj ssaków;
- 2) na podstawie tzw. prób skórnich polegających na rozrzedzaniu substancji międzykomórkowej skóry zawierającej jak wiadomo kwas hyaluronowy;
- 3) metodą wiskozymetryczną, opartą na mierzeniu zmniejszenia lepkości substratu zawierającego kwas hyaluronowy.

Wg badań Sokołowskiej w nasieniu przechowywanym metodą Miłowanowa (w temp. 0°C), hyaluronidaza w pełni zachowuje aktywność w ciągu 17 dob. Dalsze badania wykazały wreszcie, że w spermie hyaluronidaza związana jest z samymi plemnikami, a nie z płynem, w którym zawieszona są plemniki. Stężenie hyaluronidazy w plemniku i otaczającym go środowis-

ku jest wyrównane. W razie silnego rozrzedzenia spermy plemniki uwalniają część zawartą w nich hyaluronidazy do płynu. Zbytne rozcieńczenie spermy może więc pozbawić plemniki dużej ilości hyaluronidazy a ponieważ do jajowodów dostają się, jak wiadomo same plemniki bez otaczającej je cieczy, stąd to zbytne rozcieńczenie może wpłynąć na zmniejszenie zapłodnialności. Dodanie do rozrzedzonej spermy (zawierającej małą ilość plemników) — obcego gatunkowo nasienia lub samej hyaluronidazy podnosi stężenie enzymu w środowisku nasienia, tym samym więc chroni plemnik własnego gatunku przed utratą hyaluronidazy. Dla uzupełnienia należy podać, że duże ilości hyaluronidazy produkują pewne gatunki bakterii (*Staphylococcus aureus*, niektóre typy pneumokoków i streptokoków). Przypuszcza się, że hyaluronidaza bakteryjna jest ważnym czynnikiem ułatwiającym szerzenie się infekcji w skórze, gdyż rozkładając kwas hyaluronowy stanowiący lepszycze spajające komórki skóry, toruje drogę dla mechanicznego posuwania się bakterii. Poza tym hyaluronidaza zawarta jest również w dużych ilościach w jadzie węzłów, w ślinie pijawek i w jadzie pszczoł.

O enzymie-mucynaza w porównaniu z hyaluronidazą wiemy jeszcze niewiele. Enzym ten został wykryty i częściowo opisany przez badaczy radzieckich (Sokołowska). Podobnie jak hyaluronidaza enzym ten też działa na śluz czyli mucyny powodując ich rozrzedzenie. W większości jednak wypadków mucynaza rozrzedza te mucyny, na które hyaluronidaza nie działa. Na kwas hyaluronowy mucynaza nie działa zupełnie. Rozrzedzająco natomiast działa mucynaza na śluz pochwoy krowy i na wydzielinę gruczołów Cowpera knura.

A oto porównawcze zestawienie działania hyaluronidazy i mucynazy podane przez Sokołowską:

S u b s t r a t	Mucynaza	Hyaluronidaza
Śluz pochwy krowy	+	-
Śluz nasienia ogiera	-	+
Wydzieliny gruczołów Cowpera knura	+	- (+)
Substancja międzykomórkowa komórek pęcherzykowych	- (+)	+
Substancja międzykomórkowa skóry	- (+)	+
Ekstrakt pepowiny (kwas hyaluronowy)	-	+
Skrzep z męskiej macicy królika	-	-

U w a g a: + rozrzedza, — nie rozrzedza, — (+) częściowo rozrzedza.

W nasieniu buhaja, tryka, knura i ogiera mucynazy nie znaleziono. Nasienie tych zwierząt nie wpływa też na zmniejszenie się lepkości śluzu pochwoy krowy. Tymczasem pod wpływem mucynazy śluz pochwoy krowy rozrzedza się zupełnie tj. przybiera lepkość wody — przyjmowaną za jednostkę. Doświadczenia N. Szergina i innych wykazały, że gęsty śluz pochwoy przeszkadza ruchowi plemników w drogach płciowych krowy. Stąd działanie mucynazy rozrzedzającej śluz sprzyja zapłodnieniu. W toku dalszych badań stwierdzono, że wydzielanie mucynazy następuje w pochwie samic okresowo. Okres wydzielania mucynazy związany jest z okresem rui, przy czym do tej pory zbadano, że na początku rui wydzielanie jest obfitsze i w związku z tym istnieją wówczas lepsze warunki poruszania się nasienia w drogach płciowych niż w końcowej fazie rui. Ponieważ owulacja przypada na koniec rui lub nawet parę do kilkunastu niekiedy godzin po niej, stąd wynikałoby wniosek, że następuje pogarszanie się warunków poruszania się plemników w narządach płciowych szczególnie u krow w miarę zbliżenia się do momentu owulacji — momentu naj-

bardziej sprzyjającego zapłodnieniu. Według badaczy radzieckich fakt ten może mieć wpływ na zmniejszenie procentu zapłodnień, szczególnie u tych sztuk, u których owulacja występuje w kilkanaście godzin po ukończeniu okresu rui. Doświadczalne zastosowanie dodatku mucynazy do nasienia wprowadzanego sztucznie do pochwy krow, u których zauważono duże zgęstnienie śluzu — dało duże zwiększenie procentu zapłodnień (7—28%). Stwierdzono przy tym, że dodanie około 2 mg suchej mucynazy do porcji nasienia przeznaczonego dla krowy w zupełności wystarcza dla rozrzedzenia śluzu pochwoy. Jak z tego widać zastosowanie mucynazy przy unasienianiu krow może mieć praktyczne i gospodarcze znaczenie. Jest rzeczą oczywistą, że stosowanie mucynazy ma sens tylko u tych zwierząt, u których owulacja następuje w jakiś czas po ukończeniu okresu rui (u krow w 67% przeciętny czas owulacji następuje między 8—16 godziną po fazie oestrus). U większości gatunków zwierząt (np. u owiec), u których popęd płciowy ciągnie się do owulacji, plemniki zawsze znajdują warunki sprzyjające.

Tak przedstawiałyby się pokrótce zbiór dotychczasowych wiadomości o enzymach, hyaluronidazie i mucynazie. Niewątpliwie badania nad tymi enzymami, w szczególności zaś nad mucynazą nie są jeszcze kompletne, niemniej jednak już w obecnym stanie wskazują dobitnie na ich znaczenie w procesie zapłodnienia.

WACŁAW PATYRA

## STOSOWANIE DROŹDZY PRZY LECZENIU ZATKAŃ JELITA ŚLEPEGO U KONI

Zespół Katedr Patologii i Terapii Zwierząt Wydz. Wet. UMCS  
Kierownik: Prof. dr T. ŻULINSKI  
Katedra Chorób Wewnętrznych Zwierząt  
Kierownik: Prof. dr Z. FINIK

Spośród zatkań jelit grubych najbardziej uporczywe i trudne w leczeniu jest zatkanie jelita ślepego, występujące szczególnie u starszych koni i trwające do 14 dni przy dobrym stanie ogólnym. Najczęstszymi przyczynami tego schorzenia są: twarda, trudnoprzerawna karma, jednostronne karmienie, nagła zmiana karmy, kilkudniowa przerwa w pracy. Również nieprawidłowy zgrzyt i starte zęby mogą być częstymi przyczynami tych zatkań i tym właśnie można tłumaczyć zjawisko, że u koni starych z wadliwym uzębieniem schorzenie to występuje częściej niż u młodych. Przy powstawaniu i utrzymywaniu się zatkań ma zwykle duże znaczenie coraz wolniejsze przesuwanie się zawartości jelit i zależne od tego wchłanianie wody z mas pokarmowych. Odwodnione masy pokarmowe drażnią przez ucisk mechanicznie zakończenia nerwowe w ścianie jelit co powoduje trwały skurcz mięśniówki, w szczególności zwieracza jelita biodrowego i jelita ślepego. Masy pokarmowe przy zachowanym apetycie mogą gromadzić się w coraz większych ilościach. Gratzl tłumaczy zatkanie jelita ślepego jego skurczem w okolicy *ostium coecocolicum*, powodującym tak znaczne zwężenie światła jelita, że tylko części płynne pokarmu mogą się przedostać do okrężnicy, natomiast części stałe gromadzą się początkowo w głowie a później w trzonie jelita ślepego. Przy większym nagromadzeniu treści pokarmowej głowa jelita ślepego uciska na początkowy odcinek dolnego, prawego pokładu okrężnicy, co jeszcze bardziej utrudnia przedostawanie się mas pokarmowych do okrężnicy.

Klinicznie stwierdza się bóle morzyskowe o małym lub średnim natężeniu. Przerwy między napadami bólowymi mogą trwać kilka godzin do jednej doby, przy zmniejszonym lub zniesionym apetycie i przy zupełnym braku pragnienia. Defekacja jest czasami zachowana. Badaniem rektalnym można stwierdzić trzy stopnie zatkań, mianowicie zatkanie zwisającej części głowy jelita ślepego, zatkanie całej głowy jelita śle-