

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JERZY STRZEŻEK, HENRYK BIEGUSZEWSKI, TADEUSZ SZUPERSKI

Wskaźniki biochemiczne w zastosowaniu do oceny jakości nasienia zwierząt gospodarskich II. Badania nad przenikaniem albumin—J¹³¹ z krwi do plazmy nasiennej

Katedra Biochemii WSR w Olsztynie
Kierownik: prof. dr W. MINAKOWSKI

Katedra Fizjologii Zwierząt WSR w Olsztynie
Kierownik: prof. dr T. KRZYMOWSKI

Katedra Anatomii Patologicznej WSR w Olsztynie
Kierownik: doc. dr T. SZUPERSKI

Przenikanie związków wielkocząsteczkowych, szczególnie białek, z osocza krwi do tkanek nie jest jeszcze całkowicie wyjaśnione. Spośród białek osocza krwi, albuminy są głównymi składnikami i spełniają ściśle określoną rolę biologiczną, polegającą przede wszystkim na utrzymaniu stałego ciśnienia onkotycznego krwi oraz wiązaniu i transporcie różnych jonów i związków. Albuminy organizmu obejmują układ naczyniowy i pozanaczyniowy (12). Albuminy pozanaczyniowe są rozproszone w szczelinach tkankowych i limfie. Ponieważ jedynym miejscem syntezy albumin osocza jest wątroba, wobec powyższego albuminy pozanaczyniowe pochodzą z krwi, przenikając przez kapilary tkankowe.

ki, śledziona, jelito cienkie należą do najbardziej przepuszczalnych zaś mięsień sercowy, tkanka mózgowa i mięśnie szkieletowe do najmniej przepuszczalnych (6, 3). Wzmoczenie pro-

Tab. 2. Białka plazmy nasiennej tryków grup I i II

Grupa	Nr tryka	Białko g%	Fracje białkowe %					
			I	II	III	IV	V	VI
I	1	3,20	8,21	21,02	27,44	33,27	8,68	1,38
	2	3,10	10,97	21,38	25,07	32,48	7,92	2,18
II	9	4,00	15,00	17,55	27,35	29,82	8,30	2,08
	10	2,81	16,99	21,85	24,76	25,69	8,37	2,24
	11	3,04	14,99	22,24	23,61	28,38	8,03	2,75

Tab. 1. Wskaźniki jakości nasienia tryków grup I i II

Grupa	Nr tryka	Objęt. ejak. ml.	Ruch. plemn.	Koncen. plemn. mln/1 ml.	Liczba plemn. w ejak. mld.	Morf. % plemn. patol.	Anomalia	
							Wtórne %	Pierwotne %
I	1	0,85	5,0	2,27	1,93	7,30	6,58	0,72
	2	1,3	3,0	1,44	1,87	18,15	17,82	0,33
II	9	1,07	0,96	1,30	1,60	62,21	60,80	1,41
	10	0,99	2,09	1,48	1,52	41,33	40,57	0,76
	11	1,14	2,33	1,51	1,69	30,51	29,84	0,67

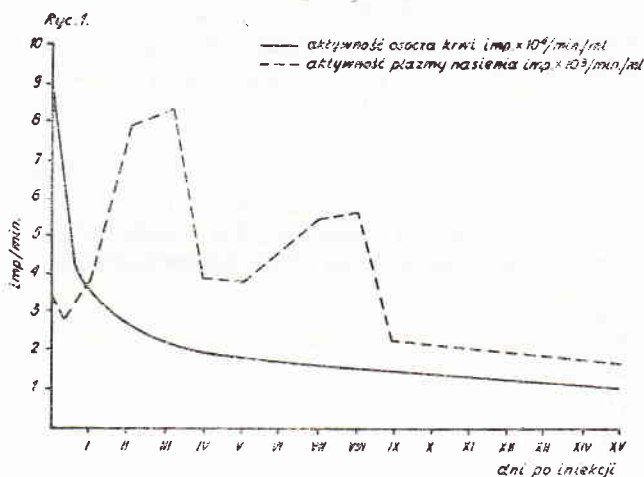
W chwili obecnej wiadomo, że istnieją dwa niezależne mechanizmy przedostawania się białek osocza krwi do płynu tkankowego. Jeden z nich uzależniony jest istnieniem małych por w śródbłonku naczyniowym pozwalającym na przejście cząsteczek o masie poniżej 250 000 (6), drugi — to czynne przenoszenie białka przez komórki w procesie nazywanym (*cytopemphysis*) (9). Należy nadmienić, że wielkość por jest ściśle związana z funkcjonalnymi procesami zachodzącymi w komórce i wykazać je można tylko za pomocą mikroskopii elektro- nowej (8).

Poszczególne narządy wykazują różną przepuszczalność dla albumin osocza: wątroba, ner-

cesów katabolicznych albumin osocza wywołane jest najczęściej stanami patologicznymi. Stany te powodują równoczesne przyspieszenie usuwania albumin osocza z organizmu (7). Czynniki zewnętrzne m. in. wahania w żywieniu mają stosunkowo mniejszy wpływ na szybkość rozpadu albumin u osobników dojrzałych (1).

Białka plazmy nasienia zwierząt gospodarskich różnią się od białek osocza krwi innymi stosunkami ilościowymi poszczególnych frakcji. Frakcja podobna do albumin występuje u osobników zdrowych w minimalnej ilości w stosunku do frakcji globulinowych plazmy nasienia, jest jednak szczególnie czułą frakcją na zmiany w układzie rozrodczym (14). W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących przenikania albumin z osocza krwi do plazmy nasiennej. Zwiększenie ilości albumin, zaobserwowane w przypadku stanów zapalnych lub różnych zaburzeń czynnościowych w jądrach i dodatkowych gruczołach płciowych (2, 5, 14, 15), nie jest dotychczas poparte dowodami wskazującymi na bardziej intensywne przenikanie albumin z osocza krwi do tkanek układu rozrodczego.

Dlatego celem niniejszej pracy, będącej kontynuacją poprzedniego doniesienia (13), była próba wyjaśnienia wzrostu zawartości frakcji podobnej do albumin w plazmie osobników wykazujących obniżoną jakość nasienia. Przyczyną tego mogą być zmiany w obrębie układu rozrodczego, bardziej intensywne przenikanie albumin z krwi do plazmy nasienia lub możliwości nasilonej syntezy białek przez zmienione gruczoły płciowe.



Ryc. 1. Aktywność osocza krwi oraz plazmy nasienia po iniekcji albuminy- J^{131} (tryk z normospermia nr 1).

Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono na 5 trykach rasy długowłnistej owcy polskiej, merynos polski oraz lincoln; z czego dwa tryki o nasieniu normalnym, stanowiły grupę kontrolną (grupa I). Grupą drugą (gr II) były trzy tryki doświadczalne w/w ras, u których podczas dwuletniej obserwacji stwierdzono zmiany jakości nasienia (m. in. obniżoną koncentrację i ruchliwość plemników, wysoki procent plemników patologicznych) oraz podwyższoną zawartość frakcji białkowej plazmy nasienia podobnej do albumin surowicy krwi. W związku z powyższym tryki te będą określane jako „patologiczne”.

Albuminę wyizolowano z surowicy owczej metodą alkoholową wg Cohna a następnie zliofilizowano. Jednorodność tego białka sprawdzono elektroforetycznie i następnie poddano oznakowaniu — J^{131} w Ośrodku Badań Jądrowych w Świerku (aktywność właściwa 1,3 mC/ml).

Do żył odstopowych tryków doświadczalnych wprowadzono albuminę — J^{131} w ilości 2—2,5 ml, zależnie od ich wagi żywej, co odpowiadało aktywności od 266—333 μ C. Pomiarów aktywności plazmy nasienia oraz osocza krwi tryków dokonywano w 15 minut po iniekcji a następnie po upływie 1 godziny, 3 i 6 godzin, a w dalszym toku obserwacji co 24 godziny. Ilość impulsów na minutę, po odjęciu tła, przeliczano na 1 ml plazmy nasienia oraz 1 ml osocza krwi. Każdorazowo określano wskaźniki jakości nasienia oraz dokonywano rozdziałów elektroforetycznych białek plazmy nasienia i oznaczeń białka ogólnego.

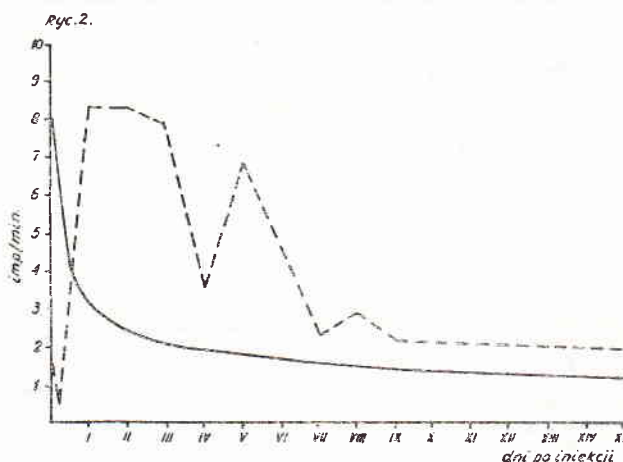
Po uboju tryków przeprowadzono badania histologiczne i histochemiczne ich układów rozrodczych. W badaniach histologicznych do barwienia preparatów użyto eozyny żółtawej oraz hematoksyliny. W badaniach histochemicznych układów rozrodczych zastosowano barwienie wg Gomoriego na tkankę łączną,

barwienie metodą Feulgena na DNA oraz Unny — Pappenheima z pyroniną na RNA. Wyniki barwień histochemicznych analizowano jakościowo.

Wyniki i omówienie

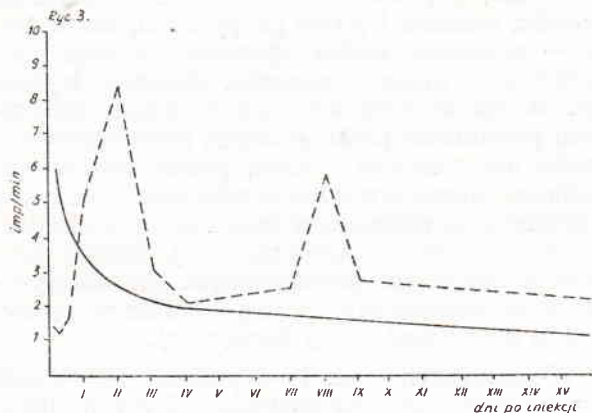
W tab. 1 przedstawiono niektóre wskaźniki jakości nasienia tryków grupy I i II, zaś w tab. 2 — zawartość białka ogólnego i frakcji białkowych w plazmie nasienia. Nasienie tryków gr. II charakteryzowało się wysokim procentem plemników patologicznych (*teratospermia*), niską koncentracją i liczbą plemników w ejakulacie (*oligospermia*) oraz zdecydowanie niską ruchliwością plemników (najczęściej stwierdzono brak ruchu — *necrospermia*). Białka tryków z nasieniem patologicznym charakteryzowały się wysoką zawartością albumin w porównaniu do tryków grupy kontrolnej.

W kolejnych ryc. 1—5 podano aktywność osocza krwi i plazmy nasienia kolejnych ejakulatów tryków obu grup doświadczalnych po iniekcji albuminy owczej znakowanej — J^{131} . Z wykresów tych wynika, że aktywność osocza krwi tryków grupy I i II obniżała się gwałtownie do 2 dnia obserwacji (w wyniku przenikania albumin do układu pozanaczyniowego), a następnie równomiernie spadała do 15 dnia obserwacji. Zarówno u tryków kontrolnych jak i w nasieniu patologicznym (gr. II) już w 15 minut po iniekcji stwierdzono dość wysoką aktywność plazmy nasienia. U tryków grupy II najwyższą aktywność plazmy nasienia zaobserwowano 2 lub 4 dnia obserwacji, natomiast u tryków grupy kontrolnej — 1 lub 3 dnia obserwacji. Na uwagę zasługuje fakt, że najwyższa aktywność nasienia tryków kontrolnych utrzymywała się przez okres 48 do 72 godzin, natomiast u tryków patologicznych zwykle przez okres około 24 godzin. W zakresie najwyższej aktywności plazmy nasienia stwierdzono pewne różnice osobnicze. Szczególnym przypadkiem wśród tryków grupy II, był osobnik nr 11 u którego



Ryc. 2. Aktywność osocza krwi oraz plazmy nasienia po iniekcji albuminy — J^{131} (tryk z normospermia nr 2).

przez cały okres obserwacji, aktywność plazmy była prawie dwukrotnie niższa niż u pozostałych tryków. Wskazywałoby to na pewną osobniczą utrudnioną przepuszczalność błon komórkowych układu rozrodczego tego tryka dla znanej albuminy.



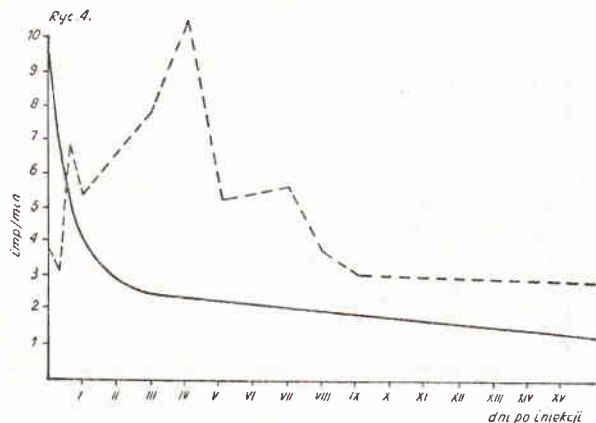
Ryc. 3. Aktywność osocza krwi oraz plazmy nasienia po iniekcji albuminy — J^{131} (tryk „patologiczny” nr 9).

W 7 lub 8 dniu obserwacji stwierdzono w plazmie wzrost aktywności, natomiast do 15 dnia aktywność zdecydowanie obniżyła się i ostatecznie była 4 — krotnie niższa w stosunku do najwyższej. Krzywa właściwej aktywności albuminy osocza u poszczególnych tryków była charakterystyczna dla krzywej szybkości katalizmu albumin osocza.

Ocena badań histologicznych i histochemicznych

Badaniem makroskopowym u tryków gr. I zmian w obrębie układu rozrodczego nie stwierdzono, natomiast w grupie II tryków zaobserwowano wyraźne zgrubienie osłonek łącznotkankowych jąder oraz gruczołów dodatkowych. Badania histologiczne wykazały (zwłaszcza u tryków 9 i 11) w kanalikach nasieniotwórczych jąder ogniska degeneracyjne nabłonka nasieniotwórczego oraz znaczne przerosty tkanki łącznej i naciek i o charakterze zapalnym w jądrach i gruczołach dodatkowych. W świetle większości kanalików wyprowadzających najądrza stwierdzono wydzielinę śluzową oraz nieliczne plemniki.

Jakościowa analiza wyników barwień histochemicznych wykazała:



Ryc. 4. Aktywność osocza krwi oraz plazmy nasienia po iniekcji albuminy — J^{131} (tryk „patologiczny” nr 10).

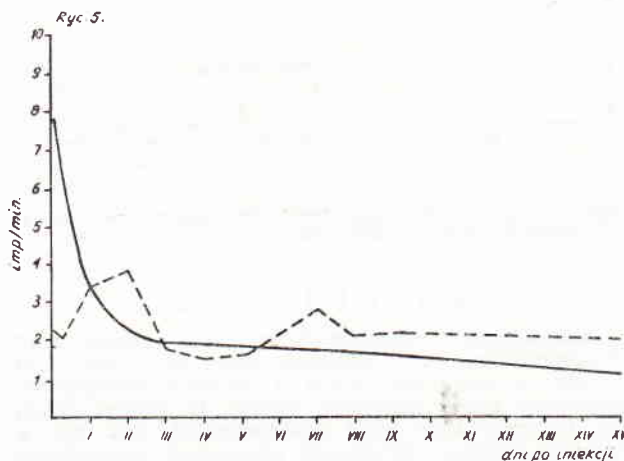
a) wzrost ilości komórek srebrochłonnych w gruczołach dodatkowych tryków gr II, co może wskazywać m. in. na intensywniejszą syntezę białek tkanki łącznej (ryc. 6 i 7),

b) brak różnic w zawartości DNA w jądrach komórek układu rozrodczego tryków gr. I i II (ryc. 8 i 9),

c) pewien wzrost zawartości RNA w cytoplazmie komórek układu rozrodczego tryków gr II (ryc. 10 i 11).

Dyskusja

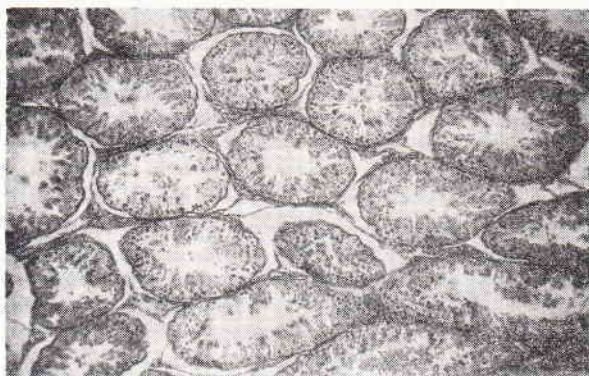
Badania nasze wykazały, że układ rozrodczy należy do narządów charakteryzujących się stosunkowo dobrą przepuszczalnością dla białek typu albumin. Do wyjaśnienia pozostaje zagadnienie, czy i w jakim stopniu procesy zapalne toczące się w układzie rozrodczym mogą powodować wzrost intensywności przenikania albumin do plazmy nasienia jako wynik zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych.



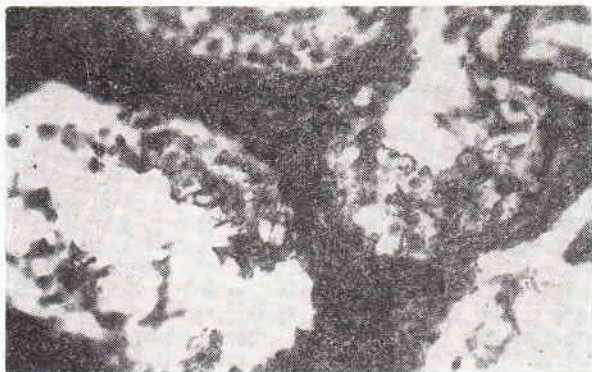
Ryc. 5. Aktywność osocza krwi oraz plazmy nasienia po iniekcji albuminy — J^{131} (tryk „patologiczny” nr 11).

Według Houcka i Forschera (4) istotą stanów zapalnych jest przenikanie zawartości komórki do przestrzeni pozakomórkowej. Zlokalizowane wewnątrz komórek aminy typu hormonów, jak np. histamina i serotoninina, wpływają na mikrokrażenie. Enzymy proteolityczne atakują wyściółkę naczyń, zwiększając ich przepuszczalność. Proteazy wewnątrzkomórkowe aktywują pewną grupę hormonów zwierzęcych z grupy kinin (szczególnie bradykininę), które obniżając ciśnienie krwi i zwiększając przepuszczalność ścian naczyń, powodują nagromadzenie się białek w miejscu reakcji zapalnej.

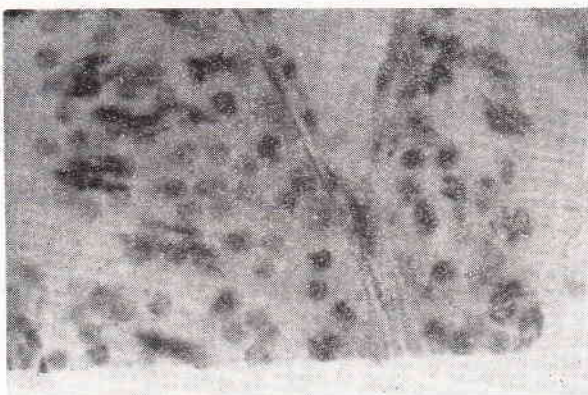
W naszych badaniach w układach rozrodczych poszczególnych tryków grupy II stwierdzono silne nacieki o charakterze zapalnym oraz przerosty tkanki łącznej. Przedstawione wyżej aspekty biochemiczne mogłyby, między innymi, tłumaczyć intensywny wzrost ilości albumin w plazmie nasienia tych tryków, które wykazywały długotrwałe zmiany jakości nasienia.



Ryc. 6. Jądro tryka o budowie prawidłowej. Barw. Gomori. Pow. 80X.



Ryc. 7. Jądro tryka gr. II (patologiczne). Barw. Gomori. Pow. 200X.



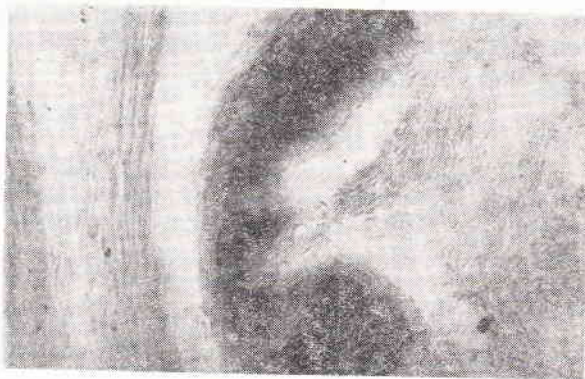
Ryc. 8. Jądro tryka prawidłowe. DNA zabarwione na kolor czarny. Barw. Feulgen. Pow. 200X.



Ryc. 9. Jądro tryka gr. II (patologiczne). DNA zabarwione na kolor czarny. Barw. Feulgen. Pow. 200X.



Ryc. 10. Prawidłowe najądrze tryka z małą ilością RNA. RNA zabarwione na kolor czarny. Barw. Unny-Pappenheima. Pow. 200X.



Ryc. 11. Najądrze tryka grupy II (patologiczne) ze zwiększoną ilością RNA. Barw. Unny-Pappenheima. Pow. 200X.

Prace Sobela i wsp. (1) nad wpływem hormonów i wieku zwierzęcia na przenikanie albumin — J^{131} z układu naczyniowego do tkanek wykazały, że przenikanie to spada z wiekiem zwierzęcia oraz wzrasta po stosowaniu estrogenów. Przyczyną tych zjawisk, wg autorów, są przypuszczalnie zmiany w mukopolisacharydach tkanki łącznej. Davidson (cyt. za 11) doniósł, że po traktowaniu estrogenami i testosteronem wzrasta ilość kwasu hialuronowego w tkankach i tym samym ich pojemność wodna. Może to mieć również wpływ na ułatwione przenikanie albumin z układu naczyniowego.

Nasze obserwacje wykazały, że mimo stwierdzonych wyraźnych zmian w tkance łącznej (wzrost komórek kolagenotwórczych) układu rozrodczego tryków patologicznych nie zauważono żadnych wyraźnych różnic w intensywności przenikania albumin z krwi do plazmy nasienia, w porównaniu do tryków kontrolnych. Pewne różnice dotyczące okresu utrzymywania się najwyższej aktywności w plazmie tryków grup doświadczalnych nie wydają się mieć istotnego znaczenia.

Wzrost aktywności plazmy zaobserwowany w 7 lub 8 dniu obserwacji mógł być związany z nasiloną syntezą białek lub peptydów z produktów enzymatycznej degradacji albuminy — J^{131} .

Wiadomym jest, że celem biologicznym procesów zapalenia jest odnowa i powrót do normalnych funkcji fizjologicznych. Procesy te związane są ze wzmożoną syntezą białek. Badania Drabkina i wsp. (10) wskazują, że powiększenie wątroby i zwiększenie jej wagi w nerczycy wiąże się również ze wzmożoną syntezą białka oraz DNA i RNA.

Zaobserwowany w naszych badaniach wzrost zawartości RNA w komórkach układu rozrodczego tryków, przy niezmienionej ilości DNA, mogłoby ewentualnie tłumaczyć wzrost ilości albumin w plazmie nasienia tryków patologicznych.

Należy zaznaczyć, że przedstawione rozważania są dyskusyjne i na ich podstawie nie można jeszcze wyciągnąć ostatecznych wniosków tłumaczących zmiany we frakcjach białkowych plazmy w stanach patologicznych układu rozrodczego. Dużą rolę będą odgrywały tu również odchylenia osobnicze.

Piśmiennictwo

1. Eieguszewski H.: Praca habil., WSR Olsztyn, 1968.
2. Buruiana L. M.: Supl. Rev. zooteh. si med. vet. 4, 30, 1966.
3. Ghien S., Sinclair D., Chang C.: Am. J. Physiol., 207, 513, 1964.
4. Houck J. C., Forscher B. K.: Chemical biology of inflammation, Proc. Conf. Held at Brook Lodge, 1967, Augusta Michigan, Pergamon Press, 1968.
5. Juneja N. L., Faulkner L. C., Hopwood M. L.: Fert. Ster. 16, 3, 361, 1965.
6. Karczewski A. F., Filatow B. F., Kulik I. I.: Fiziol. Żurnal, XIV, 6, 825, 1968.
7. Koj. A.: Postępy biochemii, 12, 2, 239, 1966.
8. Marchesi S.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 116, 3, 747, 1964.
9. Mayerson H. S., Wolfram C. G., Shirley H. H., Wasserman K.: Am. J. Physiol., 198, 155, 1960.
10. Marsh J. B., Drabkin D. L.: J. Biol. Chem., 230, 1963, 1958.
11. Sobell H., Kovacevic A. M., Ramelli G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119, 2, 358, 1965.
12. Sterling K.: J. Clin. Invest. 30, 1228, 1951.
13. Strzeżek J.: Materiały VI Zjazdu P. T. Bioch., Olsztyn, 100, 1968.
14. Strzeżek J.: Medycyna Wet., XXV, 289, 1969.
15. Szumowski P.: Revue de Pathologie Comparee, t. 1—9, 762, 505, 1964.

Adres autora: dr Jerzy Strzeżek, Olsztyn-Kortowo, WSR.

Стшежек Е., Бегушевски Г., Шуперски Т. — Биохимические показатели при оценке качества семени сельскохозяйственных животных. II. Исследования по способности проникновения альбумина — J^{131} из крови в семенную плазму.

Исследования являются продолжением предварительной работы над белками семенной плазмы барана (Medycyna Wet. 5/69). Опыты провели на 5 баранах, в том числе 2 контрольных, нормальных (группа I) и 3 подопытных (группа II), у которых 2 года наблюдали измененные свойства семени и повышение альбуминов в плазме. Целью работы было установление причин повышения уровня альбуминов в семенной плазме баранов II группы.

Установили, что половая система хорошо пропускает белки типа альбуминов. Отчетливых различий интенсивности проникновения альбуминов в семенную плазму между обоими группами не установили хотя в соединительной ткани половой системы „патологических” баранов обнаружили некоторые изменения (увеличение коллагенородных клеток). Качественным анализом гистохимических препаратов установили повышение содержания РНК в клетках

половой системы баранов II группы однако без различий содержания ДНК. Автор полагает, что повышение содержания альбуминов в семенной плазме „патологических” баранов наступает вследствие изменений в тканях половой системы (воспалительные процессы) или повышенного синтеза белков, особенно низкомолекулярных, в измененных половых клетках.

Strzeżek J., Bieguszewski H., Szuperski T. — **Biochemical indices for evaluation of the semen quality of live-stocks. II. Investigations on the penetration of albumin labelled with J^{131} from blood to semen plasma.**

The presented investigations are the continuation of the report on proteins of semen plasma of the ram (Medycyna Wet., 5/69). The investigations have been carried out on 5 rams from which two animals with normal semen were a control group (group I). The second group consisted of three rams in which there were observed some abnormalities in semen quality and the increased content of albumin in plasma. The changes persisted for two years. The purpose of the work was to estimate factors responsible for the increase of albumin in semen plasma of the rams of the second group. The obtained results indicated the reproductive system of the rams belonged to organs showing a good permeability for albumins. Although there found some changes in the connective tissue of reproductive system of the animals of the second group (an increase of collagen creative cells) there were not observed distinct differences in the permeability of albumins from blood to semen plasma in comparison to the normospermic rams (group I). The qualitative analysis of specimens of the reproductive system originating from „pathologic” animals revealed the increase of RNA; instead there were not observed any differences in the content of DNA between the above two groups. The increase of albumins of semen plasma in the rams of the second group was the result of changes within the reproductive system (inflammation), and increased protein synthesis (particularly of low molecular) in the altered reproductive systems.

SMITH R. E., REYNOLDS I. M., CLARK G. W.: **Leptospiroza doświadczalna u owiec ciężarnych. VII. Patogeneza zakażenia płodu oraz mechanizm ronienia. (Experimental leptospirosis in pregnant ewes. VII. Pathogenesis of foetal infection and mechanism of abortion).** Cornell Vet., 60, 40—52, 1970 (1).

Przedstawiono wyniki badań nad wyjaśnieniem mechanizmu ronienia u owiec ciężarnych zakażonych leptospirami. Badania przeprowadzono na 44 ciężarnych owcach zakażonych w drugiej połowie ciąży *L. pomona*. Ciężarne samice zakażano domięśniowo, doużylnie, dolożyskowo i dopłodowo. Owce poddawano ubojowi od 30 do 67 dnia po zakażeniu. Płody do badań uzyskiwano w wyniku cięcia cesarskiego. Z tkanką płuc, wątroby, nerek i łożyska owiec oraz z tkanką płuc, wątroby, nerek i treścią przewodu pokarmowego płodów przeprowadzono badania bakteriologiczne, histopatologiczne i immunofluorescencyjne. Ponadto pobrano do badań płyn otrzewnowy, opłucnowy, owodniowy i omocznioowy. Badania wykazały, że śmierć płodów była spowodowana bezpośrednim ich zakażeniem *L. pomona*. U padłych płodów na czoło zmian anatomopatologicznych wysuwały się zmiany autolityczne. Wystąpienie tych zmian uniemożliwia w dużym stopniu wykrywanie leptospir powszechnie przyjętymi metodami laboratoryjnymi.

Z. G.