

# FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JERZY STRZEŻEK, ALEKSANDER WOŁOS, JAN GLOGOWSKI

## Wskaźniki biochemiczne w zastosowaniu do oceny jakości nasienia zwierząt gospodarskich V. Immunogenne właściwości 5'-nukleotyduzy plazmy nasienia tryka

Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt WSR w Olsztynie  
Dyrektor: prof. dr W. MINAKOWSKI

Obecne w plazmie nasienia zwierząt tzw. okrywowe antygeny plemnika, wykazane po raz pierwszy przez Weila i wsp. (18), są wynikiem funkcji wydzielniczej dodatkowych gruczołów płciowych (19, 20). Antygeny te posiadają specyficzność tkankową (4, 10), osobniczą (6) oraz specyficzność grup krwi (2).

Zarówno antygeny plemnika, skupione głównie w akrosomie (16), jak i antygeny plazmy nasienia mogą powodować powstawanie specyficznych przeciwciał, głównie typu spermoglutynin i spermoprecypityn (13) oraz przeciwciał wiążących komplement i spermoposonin (17). Przeciwciała te, powstające zwłaszcza w stanach patologicznych układu rozrodczego, wywołują zjawisko tzw. autoimmunizacji samców (3, 9, 10, 22).

Szereg antygenów nasienia zwierząt posiada właściwości białek enzymatycznych (1, 15). Stąd zapewne zmiany aktywności niektórych enzymów, a pośrednio metabolizmu nasienia, mogą między innymi wynikać z procesów immunologicznych zachodzących w układzie rozrodczym samca lub mogą te procesy powodować.

Dlatego celem niniejszej pracy była próba określenia właściwości immunogennych 5'-nukleotyduzy izolowanej z plazmy nasienia tryka.

### Materiał i metody

Izolacji enzymu dokonano z plazmy nasienia tryka według metodyki podanej przez Heppela i Hilmoe z pewnymi modyfikacjami własnymi. Stopień oczyszczenia izolowanego preparatu enzymu sprawdzono metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym według Davisa.

Immunizację królików rasy białej duńskiej, wyrównanych pod względem wieku i wagi, wykonano z zastosowaniem pełnego adjuwantu Freund'a produkcji Biomed. Preparat enzymu o zawartości 4,8 mg białka na 1 ml i aktywności właściwej 1,870  $\mu$ molIP/mg białka 15 min., mieszano z odpowiednią objętością pełnego adjuwantu Freund'a. Dokonano 4 iniekcji, w odstępach siedmiodniowych, według następującego schematu:

I iniekcja (podskórnie, wzdłuż linii grzbietowej) — 0,5 ml roztworu enzymu w 0,85% NaCl i 0,5 ml pełnego adjuwantu Freund'a.

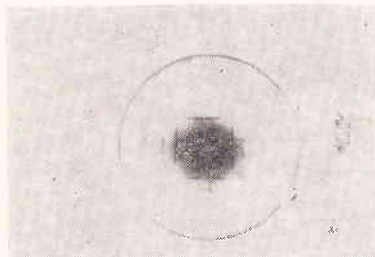
II i III iniekcja (domięśniowo) — 0,5 ml roztworu enzymu w 0,85% NaCl rozcieńczonego dodatkowo 0,85% NaCl w stosunku 1:1 i 0,5 ml pełnego adjuwantu Freund'a.

IV iniekcja (dożylnie) — 1 ml rozcieńczonego enzymu 1:1 i 0,5 ml pełnego adjuwantu Freund'a.

Króliki grupy kontrolnej otrzymywały zamiast preparatu enzymu odpowiednio ilości 0,85% NaCl zmieszane z adjuwantem Freund'a. Surowicę odpornościową otrzymaną z krwi pobranej poprzez punkcję dosercową po 7 dniach od ostatniej iniekcji. Do badań immunologicznych zastosowano metodę podwójnej dyfuzji żelowej według Ouchterlony oraz metodę immunoelektroforezy na agarze. Dokonano również obserwacji wpływu surowicy odpornościowej na aktywność 5'-nukleotyduzy.

### Wyniki

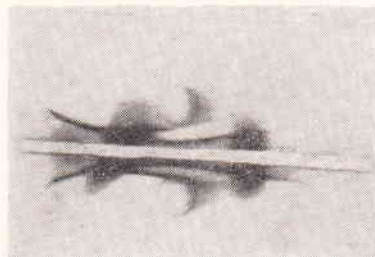
Stosując wyżej opisany schemat immunizacji udało się otrzymać anty-surowicę zawierającą przeciwciała wobec izolowanej z plazmy nasienia 5'-nukleotyduzy, które wykazano metodą dyfuzji żelowej (ryc. 1) oraz immunoelektroforezy (ryc. 2). Widoczny na ryc. 1 wyraźny łuk precypitacyjny wskazuje na obecność jednej determinanty antygenowej enzymu.



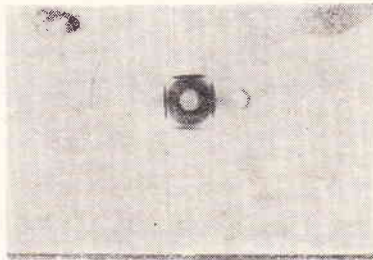
Ryc. 1. Immunodyfuzja wg Ouchterlony w układzie antysurowica — preparat 5'-nukleotyduzy. (centralny zbiorniczek — antysurowica, zbiorniczki zewnętrzne — roztwór enzymu w 0,85% NaCl)

Natomiast ekstrakt plemników tryka (przemitych kilkakrotnie 0,85% NaCl) i plazma nasienia dawały z anty-surowicą odpowiednio jeden oraz trzy łuki precypitacyjne (dwa intensywne i jeden słaby) (ryc. 3, ryc. 4). Układ linii precypitacyjnych wskazywałby na zgodność antygenową 5'-nukleotyduzy ekstraktu plemników oraz antygenów plazmy nasienia.

Należy nadmienić, że w przypadku ekstraktu plemników, powstawanie jednej linii precypitacyjnej w



Ryc. 2. Immunoelektroforeza plazmy nasienia tryka, z zastosowaniem antysurowicy wobec 5'-nukleotyduzy. (zbiorniczki startowe — plazma nasienna tryka)

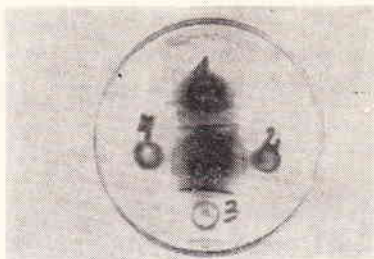


Ryc. 3. Immunodyszfa wg Ouchterlony w układzie antysurowica — plazma nasienia tryka. (centralny zbiorniczek — antysurowica, zbiorniczki zewnętrzne — plazma nasienna tryka)

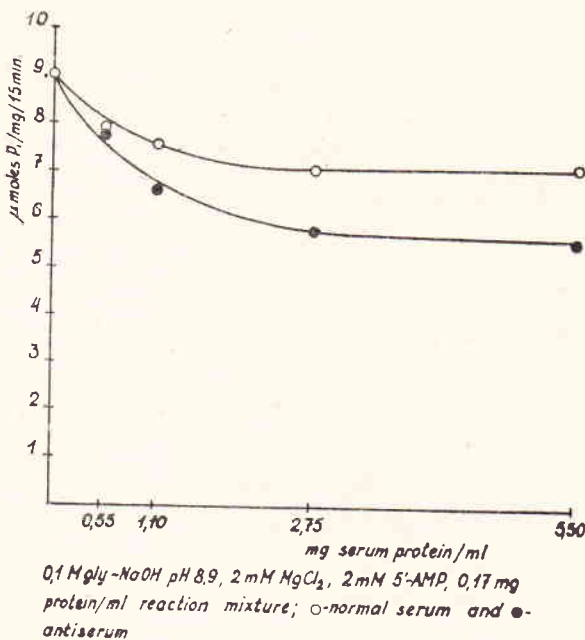
reakcji z anty-surowicą, dowodziłoby o obecności na błonie plemnika (z ejakulatu) stosunkowo silnie związanego antygeny o aktywności 5'-nukleotydyzy, obecnej w plazmie nasienia.

Agaroforeza plazmy nasienia tryka i następnie immunodyszfa (ryc. 2) wskazywałyby na istnienie antygenów plazmy o aktywności 5'-nukleotydyzy w obrębie gamma-globulin oraz w obrębie albumin. Byłoby więc to zgodne z uzyskanym rozdziałem elektroforetycznym preparatu enzymu na żelu poliakrylamidowym, gdzie wyraźnie dominuje pasmo w obrębie gamma-globulin oraz występuje pasmo mniej intensywne w obrębie albumin.

Wyniki badań wpływu anty-surowicy na aktywność 5'-nukleotydyzy przedstawiono w tab. 1. Jak wynika z tabeli ze wzrostem ilości białka anty-surowicy



Ryc. 4. Immunodyszfa wg Ouchterlony w układzie antysurowica (centralny zbiorniczek) — (zewnętrzne zbiorniczki) 1 — plazma nasienna tryka 2, 4 — ekstrakt plemników przemytych kilkakrotnie 0,85% NaCl 3 — izolowany preparat 5'-nukleotydyzy



Ryc. 5. Graficzny przebieg spadku aktywności 5'-nukleotydyzy traktowanej antysurowicą oraz surowicą normalną

Tab. 1. Wpływ antysurowicy na aktywność 5'-nukleotydyzy

Mg białka surowicy/ml próby	Aktywność względna (μmole P/mg białka enzymu)		% hamowania
	surowica normalna	antysurowica	
0,55	7,797	7,855	0
1,10	7,571	6,659	12
2,75	7,058	5,806	18
5,50	7,229	5,691	21

0,1 M bufor glicynowy pH 8,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM 5'-AMP; 0,17 mg białka enzymu/ml próby.

wicy aktywność enzymu spadała. Graficzny przebieg spadku aktywności enzymu przedstawia ryc. 5. Przy stosunku białka enzymu do białka anty-surowicy w mieszaninie inkubacyjnej 1:32 aktywność enzymu była o 21% niższa w porównaniu z aktywnością oznaczoną w obecności surowicy normalnej.

Należy podkreślić, że już przy stosunku obydwu białek 1:6 aktywność enzymu obniżała się o 12%.

### Dyskusja

Męski układ rozrodczy posiada dwa niezależne systemy antygenowe wywołujące powstawanie specyficznych przeciwciał. Jeden z nich to system antygenowy jąder, najądrzy i plemników, który w warunkach doświadczalnych powoduje zjawisko aspermatogenezy i zapalenie jąder (16, 17). Drugi system antygenowy (obecnie intensywnie badany) dotyczy specyficznie tkankowych antygenów gruczołu krokowego, pęcherzyków nasiennych oraz ich wydzielin, wchodzących w skład plazmy nasienia zwierząt.

Obecnie uważa się, że odkryte przez Weila i wsp. (18) okrywowe antygeny plemnika pochodzą z dodatkowych gruczołów płciowych, bowiem anty-surowica wobec pełnego nasienia, plazmy nasiennej i przemytych plemników jest identyczna z anty-surowicą wobec komponentów plazmy nasienia (2). Antygeny te obecne są w plazmie nawet w przypadkach azoospermii (18).

Szczególnie interesujące są badania immunologiczne nad gruczołem krokowym i jego wydzielinami (4, 12, 21). Stwierdzono mianowicie dwa antygeny występujące w tym gruczole, z których jeden posiada aktywność kwaśnej fosfatazy i 5'-nukleotydyzy. Autoprzeciwciała są wywołane przez mniej intensywny antygen (12).

Ostatnio Shulman i Orsini (11) wykazali w płynie pęcherzyków nasiennych świnki morskiej kilka komponentów białkowych spośród których jeden posiada właściwości antygeny o dużej specyficzności tkankowej. Autorzy stwierdzili również, że autoprzeciwciała produkowane przez ten komponent powodują stan zapalny pęcherzyków nasiennych. Natomiast Hekman i Rümke (4) w płynie pęcherzyków nasiennych człowieka stwierdzili obecność białka wiążącego żelazo, podobnego do laktoferyny. Boettcher (2) podobne białko nazwał scaferriną (sca-sperm coating antigens).

W dostępnym piśmiennictwie jest stosunko-

wo niewiele danych o właściwościach antygenowych białek enzymatycznych plazmy nasienia. Veselsky i Kubek (15), metodą elektroforezy, wykazali w plazmie nasienia buhaja 1—2 antygeny o aktywności hydrolaz estrowych.

Enzym 5'-nukleotydaza plazmy nasienia jest syntetyzowany u zwierząt przez pęcherzyki nasienne. Uzyskane przez nas wyniki wskazują na antygenowe właściwości tego enzymu. 5'-nukleotydaza plazmy nasiennej tryka należy do antygenów plazmy oraz tzw. okrywowych antygenów plemnika. W plazmie nasiennej występują 2—3 antygeny o aktywności 5'-nukleotydazy, zaś na powierzchni błony plemnika jeden antygen. Należy nadmienić, że nasze wstępne badania na ekstraktach plemników z najądrzy oraz ekstraktach, uzyskanych z jąder tryka z zastosowaniem anty-surowicy wobec 5'-nukleotydazy plazmy nasienia, wykazały brak luków precypitacyjnych w reakcji immunodiffuzji żelowej, mimo stwierdzonej aktywności enzymu w obu preparatach. Wskazywałoby to na specyficzność tkankową izolowanego enzymu oraz na to, że plemniki nabywają aktywność antygenową 5'-nukleotydazy po zetknięciu się z wydzielinami gruczołów dodatkowych.

Anty-surowica wobec enzymu powoduje zmianę jego aktywności. Uzyskane wyniki wskazują na reakcję hamowania. Stosunkowo niewiele prac dotyczy wpływu spermoprzeciwciała na metabolizm plemników. Między innymi Metz (8) oraz Uzunow (14) wykazali zjawisko hamowania oddychania plemników przy ich inkubacji z anty-surowicą. Nieco mniejsze hamowanie oddychania plemników stwierdził Uzunow w przypadku zastosowania w mieszaninie inkubacyjnej surowicy normalnej. Podobne zjawisko hamowania aktywności 5'-nukleotydazy przez anty-surowicę i surowicę normalną stwierdzono w niniejszej pracy.

Można przypuszczać, że podczas inkubacji anty-surowicy z izolowanym enzymem przeciwciała wywierają wpływ na miejsce allosteryczne enzymu, a tym samym dochodzi do zmiany specyficzności substratowej. Podobne wnioski wysunął Lehmann (7) oraz Isohashi i wsp. (5) badając immunogenne właściwości enzymu dehydrogenazy glutaminianowej wątroby człowieka oraz dehydrogenazy jabłczanowej wątroby szczura.

Tym niemniej mechanizm działania przeciwciała na aktywność enzymów, zwłaszcza w przypadku enzymów układu rozrodczego, nie jest jeszcze wyjaśniony. Wyjaśnienie tego mechanizmu pozwoli może na określenie przyczyn niektórych chorób męskiego układu rozrodczego.

#### Piśmiennictwo

1. Bishop D. W., Schrank W. M., Musselman A. D., Muecke E. C.: Fedn. Proc. Am. Soc. exp. Biol., 26, 646, 1967.
2. Boettcher E.: Immunology and Reproduction, Geneva 1968, Edited: R. G. Edwards.
3. Bratanow K., Dikow W., Wasilewa-Popowa J.: Immunology of Spermatozoa and Fertilization, Varna, 1, 67, 1967.
4. Hekman A., Rilmke Ph.: Immunology of Spermatozoa and Fertilization, Varna, 107, 1967.

5. Isohashi F., Shibayama K., Maruyama E., Aoki Y., Wada F.: Biochim. Biophys. Acta, 250, 14, 1971.
6. Kulangara A.: J. Immunol., 102, 1445, 1969.
7. Lehmann E. G.: Biochim. Biophys. Acta, 235, 259, 1971.
8. Metz C. B., Schel H., Bischo E. R.: J. Exp. Zool., 155, 261, 1964.
9. Rilmke Ph.: Immunology of Spermatozoa and Fertilization, Varna, 179, 1967.
10. Shulman S.: Immunology of Spermatozoa and Fertilization, Varna 187, 1967.
11. Shulman S., Orsini F.: 26-th Annual Meeting of the American Fertility Society, Washington, March 19—21, 1970.
12. Shulman S., Umrana A.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 137, 97, 1971.
13. Torńiów A.: Immunology of Spermatozoa and Fertilization, Varna, 65, 1967.
14. Uzunow G.: Weterinarnomed. nauki, 2, 97, 1971.
15. Veselsky K., Kubek A.: Anim. Blood Gr-ps. biochem. Genet., 1, 95, 1970.
16. Voisin G. A., Toullet F.: Anns. Inst. Pasteur, Paris, 114, 727, 1968.
17. Voisin G. A., Toullet F.: Immunology of Spermatozoa and Fertilization, Varna, 149, 1967.
18. Weil A. J., Kotsewalov O., Wilson J.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 92, 606, 1956.
19. Weil A. J., Rodenburg J. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 109, 567, 1962.
20. Weil A. J.: Ann. NY. Acad. Sci., 124, 267, 1965.
21. Yantorno C., Shulman S., Gonder M. J., Soanes W. A., Witebsky E.: J. Immunol., 96, 1035, 1966.
22. Yantorno C., Debanne M. T., Vottero-Cima E.: J. Reprod. Fert., 27, 311, 1971.

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

Wyrażam serdeczne podziękowanie prof. Kiryłowi Bratanow i Jego Współpracownikom za okazaną życzliwość i pomoc w czasie pobytu w Instytucie Biologii i Patologii Rozrodu Zwierząt w Sofii.

Стшежек Е., Волос А. Гльоговски Я.: Биохимические параметры применяемые в оценке качества семени сельско-хозяйственных животных. V. Иммуногенные свойства 5-нуклеотидазы плазмы семени барана.

Провели с применением полного адьюванта Фреунда иммунизацию кроликов препаратом 5-нуклеотидазы, приготовленным из плазмы семени барана. Присутствие противотел для 5-нуклеотидазы установили по методу Ухтерлони (Ouchterlony) и агарового иммуноэлектрофореза. Установили также, что 2—3 антигена плазмы барана имеют 5-нуклеотидазную активность, а полученные из эякулята и промытые живчики проявляют присутствие только одного имеющего такую же энзиматическую активность антигена. Автор полагает, что 5-нуклеотидаза является специфическим тканевым антигеном семенных пузырьков барана и принадлежит к числу антигенов оболочки живчиков этого животного. Сыворотка против 5-нуклеотидазы задерживает действие этого энзима. При пропорции белков энзима к белкам сыворотки в инкубированной смеси 1:6 активность 5-нуклеотидазы понижается на 12%, а при 1:32 — на 21% в сравнении к активности энзима установленной в присутствии нормальной сыворотки.

Strzeżek J., Wołos A., Glogowski J. — The use of biochemical indices to evaluate the quality of semen in domestic animals. V. Immunogenic properties of 5' — plasma nucleotidase of the ram semen.

There were immunized rabbits with 5' — nucleotidase, isolated from the semen plasma of the ram, with the Freund complete adjuvant. There was noted the presence of antibodies against 5'-nucleotidase after application of double agar technique acc. to Ouchterlony and agar immunoelectrophoresis. In addition, there was stated that 2—3 antigens of plasma of the ram semen were active like 5'-nucleotidase. Instead, the rinsed spermatozoons showed the presence of one antigen of the enzyme activity. It is suggested that 5'-nucleotidase is a specific antigen of semen vesicles and is related with the coat antigens of the semen. Antibodies against 5'-nucleotidase inhibit the activity of the enzyme. In case of relation of the enzyme protein to serum = 1:6, the activity of 5'-nucleotidase lowered at 12%, and at the ratio of 1:32 at 21% in comparison to the activity determined at the presence of normal serum.