

JERZY STRZEŻEK, JADWIGA ŚMIGIELSKA

## Właściwości immunologiczne dezoksyrybonukleoproteidów (DNP) izolowanych ze świeżych i przechowywanych plemników knura\*)

Z Instytutu Fizjologii i Biochemii Zwierząt AR-T w Olsztynie

Zmiany starzeniowe w plemnikach, przechowywanych *in vitro* w różnych temperaturach, stanowią jedną z przyczyn obniżonej zdolności zapładniającej oraz zwiększonej śmiertelności embrionalnej (9).

Molekularne podstawy mechanizmu wymienionych zjawisk są jeszcze mało poznane. Można przypuszczać, że proces starzenia się plemników uwarunkowany jest między innymi metaboliczną niestabiłością DNA główki plemnika.

Przeprowadzone przez Graves i Salisbury (3) badania wykazały intensywne włączenie się grupy metylowej C<sup>14</sup>-glicyny do tyminy DNA ekstrahowanego z plemników buhaja, inkubowanych w ciągu 4 godzin w temperaturze 37°C. Ci sami autorzy stwierdzili metodami autoradiograficznymi szybkie wbudowywanie się znakowanej H<sup>3</sup>-glicyny do główek plemników buhaja, zachodzące podczas przechowywania nasienia przez 4 godziny w temperaturze 37°C oraz 7 dni w temperaturze 5°C (4).

Według badań Hart i Salisbury (5) rozwój komórek jajowych żaby, zapłodnionych męskimi komórkami płciowymi o cechach starzeniowych, ulega zahamowaniu w stadium gastruli. Badania immunologiczne wskazywały na wyraźnie zaznaczone różnice we właściwościach antygenowych, pomiędzy białkami gastruli normalnie rozwijającej się a gastruli z zahamowanym dalszym rozwojem. Powyższe obserwacje sugerują, że podczas przechowywania nasienia dochodzi do istotnych zmian w wiązaniach chemicznych pomiędzy białkami zasadowymi i DNA główki plemnika, które stanowią mogą przyczynę zaburzeń transkrypcji DNA. Wydaje się, że z metaboliczną niestabiłością DNA przechowywanych plemników wiążą się także zakłócenia w przekazywaniu informacji genetycznej również na etapie translacji. Zaburzenia te stanowią mogą wyjaśnienie zwiększonej śmiertelności embrionalnej w przypadku stosowania zestarzałych męskich komórek płciowych.

Ocenę intensywności przebiegu procesów starzeniowych w plemnikach przeprowadzać można zarówno metodami autoradiograficznymi jak i immunologicznymi.

Badania Todorovic i wsp. (10) wskazują na istnienie różnic we właściwościach immunolo-

gicznych pomiędzy kompleksami DNA — białko ekstrahowanymi z tych komórek bezpośrednio po pobraniu nasienia oraz z nasienia przechowywanego.

Oдноśnie plemników knura brak jest tego typu badań. Wiadomo jednak, że praktyczne stosowanie przechowywanego kilka dni w temperaturach dodatnich lub mrożonego nasienia knura jest mało efektywne ze względu na występowanie nasilonej śmiertelności zarodkowej.

Przeprowadzone badania stanowią próbę określenia właściwości immunologicznych kompleksów dezoksyrybonukleoproteidowych (DNP), izolowanych ze świeżych i przechowywanych plemników knura.

### Materiał i metody

Nasienie od knurów (gęsta frakcja plemnikowa) pobierano metodą manualną. W połączonych ejakulatach określano koncentrację oraz ruchliwość plemników a następnie rozdzielano je na dwie objętościowo równe części. Jedną z nich rozcieńczano dwukrotnie rozcieńczalnikiem Kiev I według Röstela (7). Izolację DNP przeprowadzono bezpośrednio po rozcieńczeniu nasienia oraz po 48 godzinach przechowywania w temperaturze 18—20°C.

Drugą część badanego materiału mieszano z rozcieńczalnikiem według Salomon (8) w stosunku 1:1. DNP wyodrebniano z plemników tuż po rozcieńczeniu próby a następnie po 24 godz. przechowywaniu w ciekłym azocie i rozmrażaniu w temperaturze 37°C.

Izolację DNP przeprowadzano w temperaturze 4°C, posługując się metodą Borenfreund i wsp. (1).

Jako czynnik degradujący błony komórkowe plemników stosowano 2% 2-merkaptioetanol. Częściową deproteinizację izolowanych kompleksów przeprowadzano przy użyciu trypsyny. Otrzymane preparaty DNP rozpuszczano w roztworze 0,15 M NaCl — 0,015 M cytrynian sodu a następnie określano zawartość białka zgodnie z metodą Lowry. Uzyskane roztwory kompleksów DNP stanowiły w badaniach odpowiednie układy antygenowe. W celu określenia stopnia depolimeryzacji DNA w plemnikach z nasienia przechowywanego w temperaturze 18—20°C lub ciekłym azocie, jako układy antygenowe stosowano również roztwory DNP inkubowane przez 2 godz. w temperaturze 37°C z mieszaniną enzymów nukleolitycznych: dezoksyrybonukleaza (DNAaza): rybonukleaza (RNAaza) w stężeniu 100 µg każdego z wymienionych enzymów na 10 mg białka.

Immunizację królików przeprowadzono podając zwierzętom domięśniowo odpowiednie dawki antygenu (0,6 mg białka na dawkę) zmieszane z równą objętością kompletnego adjuwantu Freund'a (prod. Cefarm). Zastosowano schemat immunizacji podany przez Todorovic i wsp. (10). Surowice odpornościowe uzyskiwano z krwi pobranej od królików po 7 i 14 dniach od ostatniej iniekcji antygenu zaś surowice kontrolne

\*) Praca wykonana w ramach problemu resortowego Ministerstwa Rolnictwa nr 419E, koordynowanego przez Instytut Zootechniki w Krakowie.

z krwi pobranej bezpośrednio przed rozpoczęciem immunizacji.

W wyniku zastosowania różnych układów antygenowych otrzymano następujące surowice odpornościowe:

1. Surowica przeciw DNP z plemników nasienia świeżego, rozcieńczonego roztworem Kiev I.

2. Surowica przeciw DNP z plemników nasienia rozcieńczonego (Kiev I), przechowywanego przez 48 godz. w temperaturze 18–20°C.

3. Surowice przeciw DNP z plemników nasienia świeżego oraz przechowywanego w układzie Kiev I, po traktowaniu preparatów DNAazy i RNAazy.

4. Surowica przeciw DNP z plemników nasienia świeżego, rozcieńczonego roztworem Salamon.

5. Surowica przeciw DNP z plemników nasienia rozcieńczonego wg Salamon, przechowywanego w ciekłym azocie przez 24 godz.

6. Surowice przeciw DNP izolowanym z plemników nasienia przed i po zamrożeniu, poddanych trawieniu enzymami nukleolitycznymi.

Uzyskano również surowice odpornościowe przeciw plazmie nasienia, przemytym plemnikom, trypsynie, mieszaninie enzymów nukleolitycznych.

Do badań właściwości immunologicznych izolowanych kompleksów DNP zastosowano metodę podwójnej dyfuzji w żelu agarozowym według Ouchterlony.

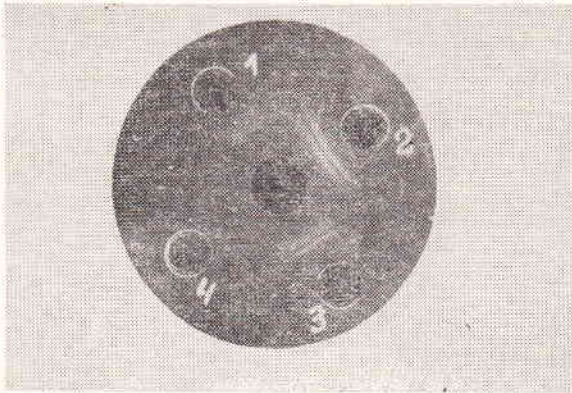
## Wyniki i omówienie

Właściwości antygenowe kompleksów DNP, izolowanych z plemników nasienia knura bezpośrednio po pobraniu i rozcieńczeniu oraz po 48 godz. przechowywaniu w rozcieńczalniku Kiev I, ilustrują ryc. 1a i 1b.

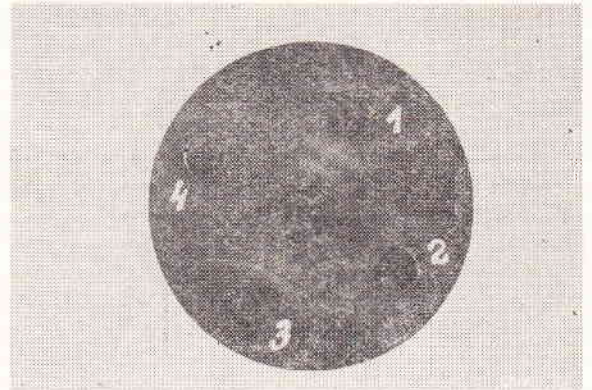
W reakcji DNP plemników świeżych z homologiczną antysurowicą obserwowano tworzenie się dwu wyraźnie zaznaczonych łuków precypitacyjnych (ryc. 1a), zaś w odpowiadającej reakcji z użyciem DNP plemników przechowywanych — jednego łuku precypitacyjnego (ryc. 1b).

W obu przypadkach nie stwierdzano reakcji pomiędzy kompleksami dezoksyrybonukleoproteidów a surowicami kontrolnymi.

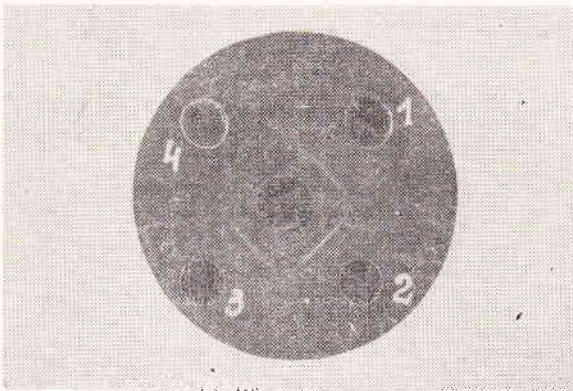
Dwugodzinna inkubacja DNP plemników przechowywanych z mieszaniną DNAazy i RNAazy prowadziła do zwiększenia ilości komponentów antygenowych w inkubowanych preparatach (ryc. 2 i 3). Tego typu zmian nie stwierdzano



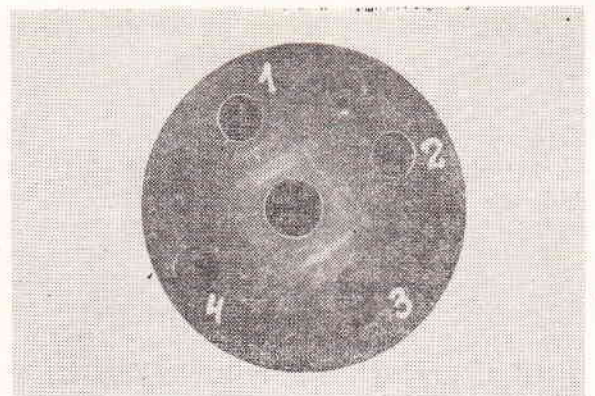
Ryc. 1a. Podwójna immunodyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — DNP plemników świeżych (Kiev I); boczne zbiorniczki — 1, 2, 3-antysurowica przeciw DNP plemników świeżych (Kiev I), 4 — surowica kontrolna



Ryc. 2. Podwójna immunodyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — DNP plemników przechowywanych + enzymy (Kiev I); boczne zbiorniczki — 1, 3-antysurowica przeciw DNP plemników przechowywanych + enzymy (Kiev I), 2, 4 — surowica kontrolna

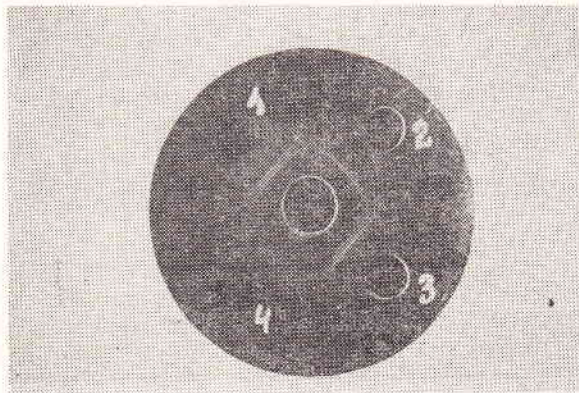


Ryc. 1b. Podwójna immunodyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — DNP plemników przechowywanych (Kiev I); boczne zbiorniczki — 1, 2, 3-antysurowica przeciw DNP plemników przechowywanych (Kiev I), 4 — surowica kontrolna



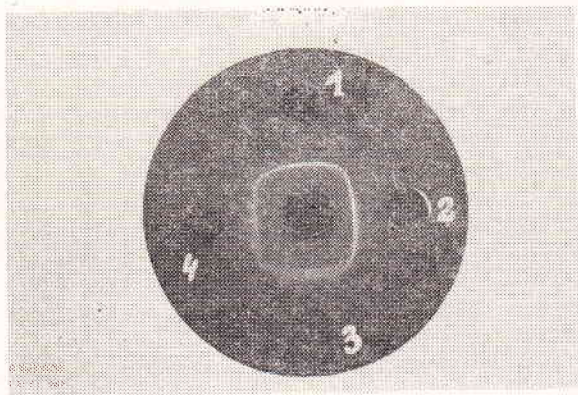
Ryc. 3. Podwójna immunodyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — antysurowica przeciw DNP plemników przechowywanych + enzymy (Kiev I); boczne zbiorniczki — 1-DNP plemników przechowywanych + enzymy (Kiev I), 2-DNAaza + RNAaza, 3-DNP plemników przechowywanych (Kiev I), 4 — trypsyna

dzano w przypadku działania enzymów nukleolitycznych na kompleksy dezoksyrybonukleoproteidowe izolowane z plemników świeżych (ryc. 4).



Ryc. 4. Podwójna immunoddyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — antysurowica przeciw DNP plemników świeżych + enzymy (Kiev I), boczne zbiorniczki — 1 — DNP plemników świeżych + enzymy (Kiev I), 2 — DNAaza + RNAaza, 3 — DNP plemników przechowywanych + enzymy (Kiev I), 4 — trypsyna

Należy nadmienić, że preparaty enzymatyczne stosowane w postępowaniu laboratoryjnym (trypsyna, DNAaza, RNAaza) wykazywały właściwości antygenowe demonstrujące się „wzmocnieniem” jednego z łuków precipitacyjnych (ryc. 5).



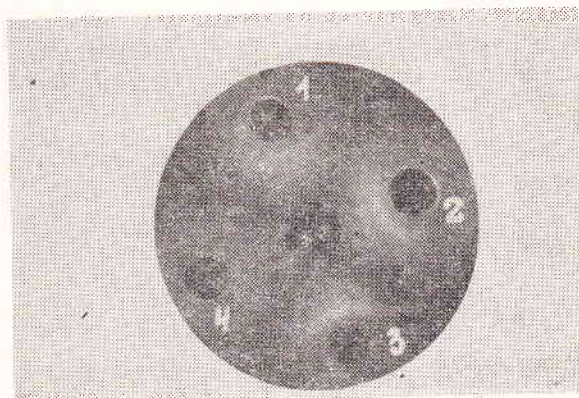
Ryc. 5. Podwójna immunoddyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — antysurowica przeciw DNAazie i RNAazie; boczne zbiorniczki — 1 — DNP plemników świeżych + enzymy (Kiev I), 2 — DNAaza + RNAaza, 3 — DNP plemników przechowywanych + enzymy (Kiev I), 4 — DNAaza + RNAaza

We wszystkich przebadanych preparatach DNP nie stwierdzano obecności białek antygenowych odpowiadających plazmie nasienia czy też przemytym plemnikom.

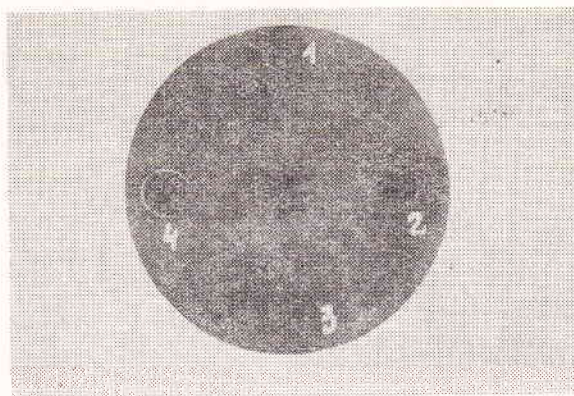
Badania dotyczące porównania właściwości antygenowych dezoksyrybonukleoproteidów izolowanych z plemników nasienia świeżego oraz zamrożonego w ciekłym azocie wskazują, że zastosowana obróbka technologiczna prowadzi do znacznego stopnia depolimeryzacji nukleoproteidów, demonstrującej się osłabieniem

lub zamaskowaniem aktywności antygenowej izolowanych kompleksów (ryc. 6a, 6b).

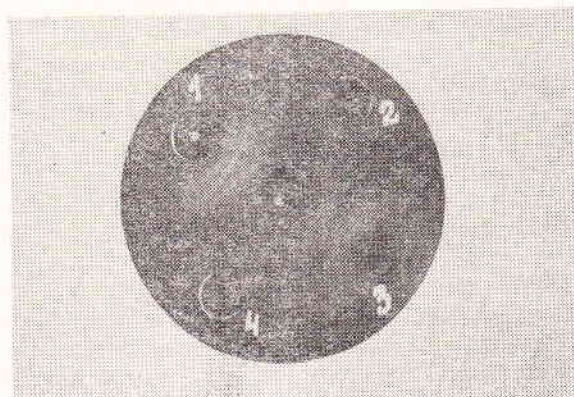
Inkubacja DNP plemników nasienia mrożonego z enzymami nukleolitycznymi wyraźnie stymuluje ich właściwości antygenowe, poprzednio słabo zaznaczone (ryc. 7). Tym niemniej, zarów-



Ryc. 6a. Podwójna immunoddyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — DNP plemników przed mrożeniem (Salamon); boczne zbiorniczki — 1, 2, 3 — antysurowica przeciw DNP plemników przed mrożeniem (Salamon), 4 — surowica kontrolna

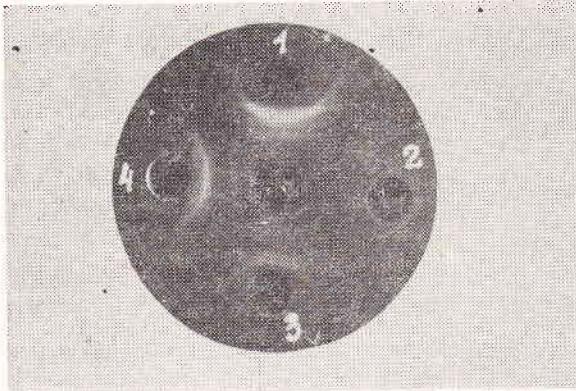


Ryc. 6b. Podwójna immunoddyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — DNP plemników po mrożeniu (Salamon); boczne zbiorniczki — 1, 2, 3 — antysurowica przeciw DNP plemników po mrożeniu (Salamon), 4 — surowica kontrolna

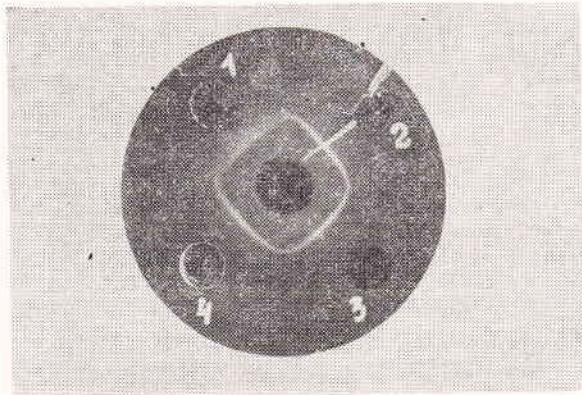


Ryc. 7. Podwójna immunoddyfuzja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — DNP plemników po mrożeniu + enzymy (Salamon); boczne zbiorniczki — 1, 3 — antysurowica przeciw DNP plemników po mrożeniu + enzymy (Salamon), 2, 4 — surowica kontrolna

no liczba jak i lokalizacja łuków precipitacyjnych są wyraźnie różne od uzyskiwanych dla DNP plemników przed mrożeniem (ryc. 8). W tym ostatnim przypadku działanie nukleaz powodowało jedynie nieznaczne zmiany właściwości antygenowych kompleksów DNP. W preparatach DNP z plemników świeżych jak i po mrożeniu występowały pozostałości enzymów nukleolitycznych, powodujące „wzmocnienie” łuku precipitacyjnego, zlokalizowanego najbliżej zbiorniczka centralnego (ryc. 9).



Ryc. 8. Podwójna immunodifuzyja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — DNP plemników przed mrożeniem (Salamon); boczne zbiorniczki — 1-antysuwrowica przeciw DNP plemników przed mrożeniem (Salamon), 2 — surowica kontrolna, 3,4 — antysuwrowica przeciw DNP plemników przed mrożeniem + enzymy (Salamon)



Ryc. 9. Podwójna immunodifuzyja żelowa w układzie: centralny zbiorniczek — antysuwrowica przeciw DNAazie i RNAazie; boczne zbiorniczki — 1 — DNP plemników przed mrożeniem + enzymy (Salamon), 2 — DNAaza + RNAaza, 3 — DNP plemników po mrożeniu + enzymy (Salamon), 4 — DNAaza + RNAaza

Uzyskane rezultaty badań wskazują, że przechowywanie nasienia knura, zarówno w temperaturach dodatnich jak i ujemnych, prowadzi do istotnych zmian depolimeryzacyjnych w nukleoproteidach plemników, wpływając tym samym na aktywność immunogeną tych kompleksów. Stąd właściwości antygenowe DNP świeżych i przechowywanych plemników knura zdecydowanie różnią się między sobą.

Oprócz DNA aktywność immunogeną wykazuje również białka zasadowe plemników.

Kolk i Samuel (6) wyizolowali z plemników człowieka dwa białka zasadowe, o ruchliwości elektroferetycznej zbliżonej do histonów plemników buhaja, charakteryzujące się silnymi właściwościami antygenowymi. Należy przypuszczać, że związana z procesami starzeniowymi depolimeryzacja nukleoproteidów główki plemnika może maskować lub indukować aktywność antygenową omawianych kompleksów.

Przebieg reakcji immunologicznej wydaje się być uzależniony od stanu, rodzaju i liczby wiązań chemicznych istniejących pomiędzy DNA i białkiem.

Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że przechowywanie plemników prowadzi do znacznego osłabienia wzajemnych oddziaływań pomiędzy DNA i białkami zasadowymi główki. We wszystkich bowiem przypadkach inkubacji DNP plemników przechowywanych z enzymami nukleolitycznymi obserwowano zróżnicowanie mozaiki antygenowej badanych preparatów. Zjawisko to mogło być spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem nukleaz na łańcuchy polinukleotydowe DNA, w efekcie którego dochodziło do zmian determinant antygenowych całych kompleksów nukleoproteidowych.

Wydaje się, że poczynione obserwacje mogą mieć duże znaczenie praktyczne. Wskazują bowiem na szybkie zmiany starzeniowe materiału genetycznego przechowywanych plemników knura, co stanowić może przyczynę nasilonej śmiertelności zarodkowej, obserwowanej u świń zwłaszcza w przypadku stosowania nasienia mrożonego.

Badania Gołyszewa i wsp. (2) dotyczące przeżywalności zarodków świni przy stosowaniu do zapłodnienia nasienia mrożonego wskazują, że do zwiększonej śmiertelności zygot dochodzi w późniejszych etapach ich rozwoju. Potwierdzałoby to wcześniejszą sugestię Harta i Salisbury (5), zgodnie z którą obecność zestarzałego materiału genetycznego męskiej komórki piciowej decyduje o hamowaniu procesu biosyntezy białka w rozwijającej się zygocie na etapie translacji.

Wyniki przeprowadzonych przez nas badań wskazują na zmianę struktury antygenowej materiału nukleoproteidowego izolowanego z przechowywanych plemników knura w porównaniu z kompleksami nukleoproteidowymi plemników świeżych.

#### Piśmiennictwo

1. Borenfreund E., Pitt E., Bendich A.: Nature, Lond., 191, 1375, 1961.
2. Gołyszew N. A., Komanow W. P., Chaczepuridzie E. L.: Vest. sel.-choz. Nauki Mosk., 2, 96, 1977.
3. Graves C. N., Salisbury G. W.: Fedn. Proc., 22, 569, 1963.
4. Graves C. N., Salisbury G. W.: Fedn. Proc., 25, 314, 1966.
5. Hart R. G., Salisbury G. W.: Fedn. Proc., 26, 645, 1967.
6. Kolk A. H. J., Samuel T.: Proc. III-th Internat. Symp. on Immunology of Reprod. Varna 24, 1975.
7. Röstel W.: Tierärztl. Umsch., 7, 375, 1974.
8. Salamon S.: Proc. VIII-th Int. Congress on Anim. Reprod. and Artific. Inseminat., Cracow 1969, vol. IV, 1976.
9. Salisbury G. W., Hart R. G.: Biology Reprod., Suppl. 2, 1, 1970.
10. Todorovic R. A., Graves N., Salisbury G. W.: J. Dairy Sci. 52, 1415, 1969.

Adres autora: doc. dr habil. Jerzy Śtrzeżek ul. Kaliningradzka 41 m. 90, 10-437 Olsztyn.

Стшежек Е., Сьмигельская Я. — Иммунологические свойства дезоксирибонуклеопротеидов (DNP), изолированных из свежих и хранимых живчиков хряка.

Методом двойной диффузии в агаровом геле сравнивали антигенные свойства DNP, изолированных из живчиков хряка, полученных непосредственно после разбавления семени, а также хранимых живчиков (48 часов в температуре 18—20°C в системе разбавителя Киев I или замороженных в жидком азоте по методу Саламон). Результаты иммунодиффузии указали на существенные изменения антигенной структуры DNP, изолированных из хранимых живчиков по сравнению с DNP свежих живчиков.

Следует предполагать, что быстрое старение генетического материала хранимых живчиков может являться причиной интенсивной эмбриональной смертности, наблюдаемой особенно в случае применения семени, замораживаемого в жидком азоте.

Strzeżek J., Śmigielska J. — Immunological characteristics of deoxyribonucleoproteins (DNP) isolated from fresh and stored boar spermatozoons.

The antigenic characteristics of DNP isolated from fresh boar spermatozoons and those stored at 18—20°C for 48 hours (diluent, Kiev I or frozen in liquid nitrogen acc. to Salamon's method) were compared by means of the gel-agarose double diffusion technique. The findings showed that essential changes were observed in the antigenic structure of DNP of fresh and stored spermatozoons. The authors suggest that the rapid changes in the genetic material of spermatozoons may be the cause of an increased embryonal mortality observed particularly in case of the use of frozen spermatozoons.

## PROFILAKTYKA I HIGIENA PRODUKCJI ZWIERZĘCEJ

MIECZYŚLAW MAJEK, ANDRZEJ WANDURSKI  
*Szamocin*

### Spostrzeżenia nad zwalczaniem leptospirozy świń w fermie przemysłowej

Leptospiroza w dużych skupiskach świń może stanowić poważny problem epizootyczny, ekonomiczny, a także epidemiologiczny (2, 6, 7). W niniejszym doniesieniu przedstawiono wyniki zwalczania leptospirozy świń poprzez leczenie stada podstawowego streptomycyną.

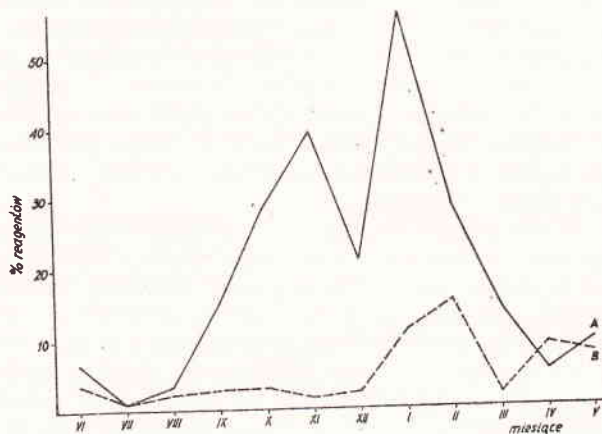
#### Materiał i metody

Obserwacje przeprowadzono w fermie przemysłowej typu Gi-Gi w miejscowości „S”. Wiosną 1973 r. fermę zasiedlono świniami uznаныmi na podstawie testów serologicznych za wolne od leptospirozy. W trakcie badań kontrolnych 3366 loch i knurów ze stada podstawowego w 1974 r. ujawniono 390 świń reagujących serologicznie na leptospirozę, co stanowiło 11,6% badanych zwierząt. Wszystkie te świny zgodnie z obowiązującą wówczas instrukcją Ministerstwa Rolnictwa (4) wyeliminowano z hodowli. W 1975 r. podczas badań 3501 świń ze stada podstawowego ujawniono i w większości zlikwidowano 488 loch i knurów, co stanowiło 13,9% badanych. Od października 1975 r. udział reagentów zaczął gwałtownie wzrastać osiągając w styczniu 1976 r. 55,6% przebadanych świń. Pomimo tego nie obserwowano ronień na tle leptospirozy. W tej sytuacji odstąpiono od eliminowania reagentów, gdyż groziło to zakłóceniami w technologii rozrodu i zachwianiem produkcji. Natomiast w porozumieniu z Ministerstwem Rolnictwa wprowadzono leczenie knurów, loch i loszek remontowych streptomycyną.

W dniach 7—10 czerwca 1976 r. dokonano leczenia stada podstawowego fermy „S”. Każdej świni wstrzyknięto dwukrotnie w odstępie 48 godzin po 4,0 streptomycyny w 40 ml płynu fizjologicznego. Ponadto każda samica przerzucana na porodówkę otrzymywała jednorazowo 4,0 streptomycyny w 40 ml płynu fizjologicznego.

#### Wyniki

Na ryc. 1 przedstawiono występowanie seroreagentów w okresie jednego roku przed zastosowaniem leczenia — od czerwca 1975 do maja 1976 r. i w ciągu roku po zastosowaniu leczenia streptomycyną tj. od czerwca 1976 do maja 1977 r. Przed leczeniem najwyższy odsetek seroreagentów obserwowano zimą i jesienią (styczeń 55,6%, listopad 38,9%, październik 28,8%, luty 28,6%). Po przeprowadzonej kuracji stwierdzono wydatny spadek odsetka seroreagentów



Ryc. 1. Odsetek świń reagujących serologicznie na leptospirozę. A — przed leczeniem, B — po leczeniu streptomycyną