

JADWIGA ŚMIGIELSKA, JERZY STRZEŻEK

Aktywność inhibitorów akrosyny w plazmie podczas zamrażania nasienia buhajów w ciekłym azocie *)

Z Zakładu Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR-T w Olsztynie

Związane z wewnętrzną błoną akrosomu enzymy trypsynopodobne, określane mianem akrosyny lub proteinaz akrosomowych, w plemnikach ssaków do momentu kapacytacji występują w formie nieaktywnych proenzymów lub też tworzą również nieaktywne połączenia ze swoistymi inhibitorami, występującymi w akrosomowym regionie komórki (1, 5, 6, 18, 19). Biochemiczny mechanizm powstawania jak i dysocjacji kompleksu — akrosyna-inhibitor akrosyny — nie został dotychczas poznany. Rozpad omawianego kompleksu zachodzi najprawdopodobniej podczas procesu kapacytacji (5, 6, 10, 16, 19).

Obecność inhibitorów akrosyny stwierdzono również w plazmie nasienia wielu gatunków zwierząt, przy czym formy molekularne inhibitorów plazmowych odpowiadają występującym w akrosomach plemników (2, 3, 7, 10, 12, 17). Plazmowe inhibitory proteinaz akrosomowych syntetyzowane są przez komórki nabłonkowe męskiego układu rozrodczego, głównie przez gruczoły pęcherzykowe, najądrza i jądra (4, 11, 13).

Z plazmy nasienia oraz ekstraktów akrosomowych ejakulowanych plemników buhaja wyizolowano dwa, stabilne w środowisku kwaśnym (pH 2,7—3,0), polipeptydowe inhibitory akrosyny, określane odpowiednio jako BUSI-I i BUSI-II (2). Dominującą w plazmie formą BUSI-I jest znacznie silniejszym inhibitorem proteinaz akrosomowych w porównaniu do występującej głównie w obrębie akrosomu formy BUSI-II. Wydaje się, że jedną z funkcji inhibitorów plazmowych jest szybka inaktywacja akrosyny uwalnianej z uszkodzonych plemników, zabezpieczająca białka nasienia i tkanki układu rozrodczego przed proteolizą.

Technologia zamrażania nasienia w ciekłym azocie prowadzić może do zmian morfologicznych w plemnikach oraz wyraźnego zwiększenia przepuszczalności błon plazmatycznych tych komórek i związanego z powyższym „wycieku” enzymów akrosomu i wstawki do środowiska zewnątrzkomórkowego (8).

Przypuszczalnie w omawianych przypadkach dochodzić może również do zmian aktywności inhibitorów akrosyny w plazmie, spowodowa-

nych „wyciekiem” inhibitorów z akrosomu lub też łączeniem się inhibitorów plazmowych z proteinazami akrosomowymi uwalnianymi z plemników. Celowym więc wydawało się prześledzenie zachowania się aktywności inhibitorów akrosyny w plazmie podczas obróbki technologicznej nasienia buhajów, z równoczesnym określeniem przydatności tego typu badań dla kontroli prawidłowości przebiegu procesu zamrażania nasienia w ciekłym azocie.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło nasienie pobierane od buhajów rozplodowych, użytkowanych w PZUZ w Olsztynie, oraz od młodych, około 12 miesięcznych buhajków, pochodzących z Wychowalni w Wopławce woj. olsztyńskie. Nasienie pobierano od zwierząt w miesiącach marzec—czerwiec. Zamrażanie prób w ciekłym azocie przeprowadzano zgodnie z powszechnie stosowaną technologią. Na poszczególnych etapach obróbki technologicznej badanego materiału wykonywano oznaczanie aktywności inhibitorów akrosyny w plazmie lub płynie nadosadowym, posługując się metodą spektrofotometryczną (2), przy zastosowaniu chlorowodoru estru etylowego N- α -benzoyl- α -argininy jako substratu. Uzyskane wyniki podano w jednostkach na ml plazmy. Jako jednostkę aktywności inhibitora przyjęto taką jego ilość, która hamowała hydrolizę 1 uM substratu w ciągu 1 minuty, w temperaturze 25°C.

Próby do analizy biochemicznej przygotowywano zgodnie z niżej opisaną, sprawdzoną w naszym laboratorium metodą, zabezpieczającą plemniki przed uszkodzeniem. Nasienie umieszczano w probówkach plastikowych lub szklanych silikonowych i wstępnie odwirowywano przy 600 \times g, przez 20 minut, w temperaturze 5°C. Odciągnięty supernatant wirowano ponownie przez 30 minut, w temperaturze 5°C przy 14 000 \times g. Uzyskany nadsącz przechowywano w temperaturze -20°C do czasu wykonania pomiarów.

Wyniki i omówienie

Aktywność inhibitorów akrosyny w plazmie nasienia buhajów rozplodowych, bezpośrednio po pobraniu prób, wynosiła $25,7 \pm 3,4$ U/ml (tab. 1). W nasieniu młodych 12-miesięcznych buhaj-

Tab. 1. Aktywność inhibitorów akrosyny (U/ml) w plazmie nasienia buhajów rozplodowych

n=25	\bar{x}	Sx	V%	r
Nasienie świeże	25,7	3,4	13,4	-0,143
Nasienie rozcieńczone	35,7	14,9	41,9	+0,291
Nasienie ekwilibrowane	32,4	18,8	58,2	+0,383
Nasienie zamrożone	33,2	19,9	59,9	+0,389

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

ków uzyskiwano wartości znacznie niższe, wynoszące średnio $19,7 \pm 10,3$ U/ml (tab. 2A). Na poszczególnych etapach obróbki technologicznej nasienia, pochodzącego od zwierząt obu grup, obserwowano wzrost aktywności inhibitorów w plazmie, zaznaczający się szczególnie wyraźnie na etapie rozcieńczania, w przypadku prób pobranych od buhajów rozplodowych, oraz na etapie zamrażania nasienia młodych buhajów. Stwierdzono ponadto znaczne różnice w indywidualnej wrażliwości poszczególnych prób nasienia zwierząt obu grup na proces obróbki technologicznej, wyrażające się wzrastającymi wartościami średniego odchylenia standardowego i współczynnika zmienności.

Tab. 2. Aktywność inhibitorów akrosyny (U/ml) w plazmie nasienia młodych buhajów

A.

n=50	\bar{x}	Sx	V%	r
Nasienie świeże	19,7	10,3	52,4	+0,108
Nasienie rozcieńczone	32,5	15,9	48,2	+0,168
Nasienie ekwilibrowane	33,9	18,1	53,4	+0,157
Nasienie zamrażane	37,7	20,2	53,4	-0,185

B.

n=27	\bar{x}	Sx	V%
Nasienie świeże	12,1	5,3	43,9
Nasienie rozcieńczone	30,1	15,2	50,7
Nasienie ekwilibrowane	31,6	16,1	50,9
Nasienie zamrażane	30,3	19,7	65,2

C.

n=23	\bar{x}	Sx	V%
Nasienie świeże	28,5	7,1	25,0
Nasienie rozcieńczone	35,3	16,7	47,3
Nasienie ekwilibrowane	36,5	18,9	51,7
Nasienie zamrażane	45,2	17,5	38,8

W dostępnej literaturze nie znaleziono danych porównawczych, dotyczących aktywności inhibitorów akrosyny w plazmie nasienia buhajów jak również zachowania się tego wskaźnika na poszczególnych etapach technologii mrożenia nasienia.

Obserwowana w badaniach własnych niższa wyjściowa aktywność inhibitorów w plazmie nasienia młodych buhajów, w porównaniu do stwierdzonej u buhajów rozplodowych, pozostawać może w bezpośrednim związku z ich syntezą w męskim układzie rozrodczym. Przemawia za tym fakt, że spośród 50 przebadanych prób nasienia młodych buhajów w 27 przypadkach wyjściowa aktywność inhibitorów w plazmie była znacznie niższa od wartości średniej wyliczanej dla całej grupy (tab. 2A), zaś w pozostałych 23 próbach — zbliżona do obserwowanej w grupie buhajów rozplodowych (tab. 2C).

Stwierdzana na poszczególnych etapach mrożenia nasienia buhajów rozplodowych dodatnia korelacja pomiędzy koncentracją plemników (mln/ml) a aktywnością inhibitorów akrosyny w plazmie (U/ml) wydaje się wskazywać na uwalnianie inhibitorów z akrosomów, spowodowane najprawdopodobniej uszkodzeniem lipoproteinowych błon plemników podczas obróbki technologicznej nasienia.

Powyższa sugestia znajduje pewne uzasadnienie w badaniach Zaneveld i wsp. (15, 18), zgodnie z którymi bezpośrednio po ejakulacji dochodzi do absorbowania się występujących w plazmie inhibitorów akrosyny na powierzchni błony plazmatycznej plemnika, zaś obecny na terenie akrosomu kompleks akrosyna-inhibitor akrosyny ulegać może dysocjacji w pH 3,0.

Należy przypuszczać, że podczas zamrażania nasienia buhajów dochodzi do rozpadu ww. kompleksu i „wycieku” inhibitorów z uszkodzonych działaniem niskich temperatur plemników oraz uwalniania omawianych substancji z powierzchni błony plazmatycznej. Stopień wzrostu aktywności inhibitorów akrosyny w płynie nadosadowym na poszczególnych etapach obróbki technologicznej nasienia świadczyłby więc o wielkości uszkodzenia błon plemników.

W odróżnieniu od nasienia buhajów dorosłych uwalnianie lub „wyciek” inhibitorów z plemników młodych buhajów zachodzi również bezpośrednio po pobraniu prób. Potwierdzałoby to nasze wcześniejsze obserwacje, wskazujące na dużą wrażliwość lub niedojrzałość błon męskich komórek płciowych, pochodzących od 12—16 miesięcznych buhajów (9).

Na podstawie wyników uzyskanych w przeprowadzonych przez nas badaniach dość trudno jest wnioskować, jaki wpływ może mieć obserwowany podczas mrożenia nasienia buhajów wzrost aktywności inhibitorów akrosyny w plazmie na zdolność zapładniającą plemników. W warunkach *in vitro* inaktywacja lub uwalnianie inhibitorów z kompleksowych połączeń z proteinazami akrosomowymi zachodzi dopiero podczas kapacytacji plemników w żeńskim układzie rozrodczym. Stąd ekstrakty akrosomowe uzyskiwane z plemników kapacytowanych charakteryzują się znacznie wyższą aktywnością akrosyny w porównaniu z obserwowaną w ekstraktach plemników ejakulowanych (14).

Można przypuszczać, że obserwowany w badaniach własnych wzrost aktywności inhibitorów w plazmie pozostaje w bezpośrednim związku ze spowodowaną czynnościami technologicznymi, zbyt wczesną aktywacją proteinaz akrosomowych, obniżającą zdolność zapładniającą plemników.

Z powyższych względów oznaczanie aktywności inhibitorów akrosyny w plazmie powinno istotny wskaźnik w ocenie jakości nasienia, przeprowadzanej przez laboratorium Zakładów Unasieniania Zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Brown C. R., Hartree E. F.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1909, 1975.
2. Cechova D., Fritz H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 401, 1976.
3. Fink E., Jaumann E., Fritz H., Ingrish H., Werle E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1591, 1971.
4. Hirschhauser C., Klonke M.: Fert. Steril. 21, 360, 1971.
5. Hirschhauser C., Baudner S.: Fert. Steril. 23, 393, 1973.
6. Polakoski K. L., Zaneveld L. J. D., Williams W. L.: Biochem. biophys. Res. Commun., 45, 381, 1971.
7. Stambaugh R., Brackett B. G., Mastroianni L.: Biology Reprod. 1, 223, 1969.
8. Stambaugh R., Smith M.: Science 186, 745, 1974.
9. Strzeżek J., Smigielska J. D., Taha Jassim Al-Taha: Medycyna Wet. (oddano do druku, 1978 r.).
10. Suominen J. J. O., Niemi M.: Reprod. Fert. 29, 163, 1972.
11. Suominen J. J. O., Satchell B. P.: Repr. Fert. 30, 235, 1972.
12. Tauber P. F., Zaneveld L. J. D., Propping D., Schumacher G. F. B.: J. Reprod. Fert. 46, 165, 1976.
13. Wendt V., Schleming W. D., Schill W. B., Tscheschett W., Fritz H.: Proc. VIII Congr. Anim. Reprod. 4, 947, 1976.
14. Zaneveld L. J. D., Srivastava P. N., Williams W. L.: J. Reprod. Fert. 20, 337, 1969.
15. Zaneveld L. J. D., Srivastava P. N., Williams W. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1172, 1970.
16. Zaneveld L. J. D., Robertson R. T., Kesler M., Williams W. L.: J. Reprod. Fert. 25, 387, 1971.
17. Zaneveld L. J. D., Dragoje B. M., Schumacher G. F. B.: Science 177, 702, 1972.
18. Zaneveld L. J. D., Polakoski K. L., Williams W. L.: Biology Reprod. 9, 219, 1973.
19. Zaneveld L. J. D., Schumacher G. F. B., Gritz H., Fink E., Jaumann E.: J. Reprod. Fert. 32, 525, 1973.

Adres autora: dr Jadwiga Smigielska, 10-718 Olsztyn-Kortowo, bl. 37, p. 226.

Смигельская Я., Стшежек Е. — Активность ингибиторов акросина в плазме во время замораживания семени быков в жидком азоте.

На отдельных этапах замораживания семени быков определяли активность ингибиторов акросина в плазме или в надосадочной жидкости пользуясь спектрофотометрическим методом.

Обнаружили значительно низшую исходную активность ингибиторов акросина в плазме семени молодых быков по сравнению с быками-производителями. У животных обеих групп показали отчетливый рост активности ингибиторов на отдельных этапах технологии замораживания семени. Наблюдаемые изменения вроде указывают на криобиохимическое повреждение живчиков. В результате этих изменений следует „вытекание” ингибиторов из акросом или их отщепление от плазматических оболочек живчиков.

Śmigielska J., Strzeżek J. — The activity of acrosine inhibitors in semen plasma in the course of freezing of bull's semen in a liquid nitrogen.

The activity of acrosine inhibitors in semen plasma and supernatant was determined spectrophotometrically on various stages of bull's semen freezing.

It was found a significantly lower initial activity of acrosine inhibitors in the semen of young bulls in comparison to that in reproducers. In both groups of animals there was noted a clearly marked increase of the activity of the inhibitors on particular stages of semen freezing. The observed changes can point to cryobiochemic destruction of spermatozoons, causing a leak of acrosine inhibitors of their detaching from plasmatic membranes of spermatozoons.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

STEFAN STEPKOWSKI, STANISŁAW KLIMONT

Obserwacje nad hodowlą *in vitro* *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895)

Z Zakładu Chorób Drobiu Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Zagadnienie namnażania *in vitro* wiciowca *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895), etiologicznego czynnika zakaźnego zapalenia jelit ślepych i wątroby u ptaków grzebiących, było przedmiotem badań od dość dawna. Pierwsze próby w tym kierunku podjął w 1924 r. Drbohlav (cyt. 13). Badacz ten sporządził do namnażania *H. meleagridis* podłoże dwufazowe, w którym fazę stałą stanowił koagulat białka jaja kurzego lub agar odżywczy a fazę płynną bulion mięsny wzgl. płyn Locke'a. Podłoże Drbohlava zmodyfikował Tyzzer (cyt. 13), używając jako fazy płynnej surowicę końską, wzbogaconą dodatkiem skrobi ryżowej. Z kolei Bayon i Bishop (cyt. 13) przygotowali pożywkę jednofazową, którą stanowiła surowica bydleca, rozcieńczona płynem Ringera. Następnie DeVolt (cyt. 13) zastosował do namnażania *H. meleagridis* płyn Locke'a, zalkalizowany przy pomocy NaOH i wzbogacony surowicą indyczą oraz skrobią ryżową; sporządzona przez DeVolta pożywka zale-

cana jest przez niektórych autorów do dziś (16). Nieco później Delappe wykorzystał do hodowli *H. meleagridis* podłoże, przygotowane przez Dobella i Laidlawa do namnażania *Entamoeba histolytica* (2, cyt. 13).

Nowych możliwości namnażania *in vitro* *H. meleagridis* dostarczyły podjęte w 1960 r. obserwacje Lessera (8). Badacz ten pierwszy wykorzystał do hodowli wiciowca płyn tkankowy Parkera, wzbogacony surowicą i skrobią ryżową (9). Na tej pożywce Lund i wsp. (14) utrzymywał *H. meleagridis* w hodowli *in vitro* przez ponad 1000 przesiewów. Późniejsze obserwacje Lessera wykazały zależność namnażania się *H. meleagridis* od występowania w posiewach i rodzaju flory bakteryjnej (11, 12), której zniszczenie pociąga zwykle za sobą, co wykazało wielu badaczy, obumieranie wiciowca (1, 4, 5, 6, 14). Niemniej Lesser po zastosowaniu pożywki, zawierającej poza płynem Parkera, surowicą i skrobią ryżową również jony