

ANDRZEJ DUBIEL, JACEK KRÓLIŃSKI,
CZESŁAWA KARPIAK, JANUSZ MADEJ*

Właściwości nasienia królików przed i po wyłączeniu wydzieliny gruczołu pęcherzykowego*)

Katedra Patologii Rozrodu Zwierząt i Klinika Położnicza Wydziału Weterynaryjnego AR,
* Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Weterynaryjnego AR,
Pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Ocena przydatności nasienia królika do celów konserwacji i unasienniania opiera się głównie na wynikach rutynowego badania ejakulatów (2, 3). W zaburzeniach płodności przeprowadza się także badania uzupełniające: bakteriologiczne, endokrynologiczne, biochemiczne itd. Ustalenie wpływu niektórych hormonów sterydowych i gonadotropowych na narząd płciowy samców płodnych i z zaburzeniami płodności, jak również składu biochemicznego wydzielin różnych odcinków układu płciowego mogłoby zmienić zapatrywanie na przydatność królika — reproduktora do celów sztucznego unasienniania.

Wcześniej przeprowadzone badania w ośrodku wrocławskim wykazały wysoki poziom aktywności gamma-glutamylotranspeptydazy (GGTP) i fosfatazy zasadowej (AP) w nasieniu rasowych królików (5, 6). Udowodniono także, iż zasadniczy wpływ na objętość ejakulatów królików ma wydzielina dodatkowych gruczołów płciowych i pozostałych odcinków dróg wyprowadzających układu płciowego, a nie płyn produkowany przez jądra, najądrza i nasienio wody. Natomiast głównym źródłem aktywności GGTP, AP i AspAT (aminotransferaza asparaginowa) w analizowanym nasieniu jest wydzielina jąder i najądrzy (6).

Prowadzone w tym kierunku dalsze badania miały na celu wykazanie właściwości nasienia samców — królików po wyłączeniu wydzieliny gruczołu pęcherzykowego (bańkowego).

Materiał i metody

Do badań użyto ejakulatów królików rasy czerwonej nowozelandzkiej (14 sztuk), srokacz niemiecki (6 sztuk) oraz wiedeński niebieski (1 sztuka) w wieku 1—2 lat, o masie ciała 3—6 kg.

Po pobraniu materiału przy pomocy sztucznej pochwy 2 razy w tygodniu (w odstępach 2—4 dni) przeprowadzano ocenę wstępną nasienia, polegającą na określeniu jego objętości, barwy, konsystencji, odsetka plemników o ruchu prawidłowym oraz ich morfologii i koncentracji w jednostce objętości nasienia. W świeżych ejakulatach oznaczano również aktywność GGTP metodą Szewczuka-Orłowskiego, fosfatazę alkaliczną sposobem Bodańskiego, a AspAT metodą Rejtmana i Fränkla. Łącznie przebadano 280 ejakulatów.

W drugim etapie doświadczenia zwierzęta podzielono na trzy grupy. Po dokonaniu laparotomii w linii

białej samcom pierwszej (8 sztuk) i drugiej grupy (7 sztuk) wprowadzono do gruczołów pęcherzykowych 2% (grupa pierwsza) i 4% AgNO_3 (grupa druga) w ilości 1—2 ml, w celu zniszczenia nabłonka wydzielniczego i wyłączenia jego wydzieliny ze składu ejakulatów. Zabiegi operacyjne przeprowadzono w premedykacji stosując dożylnie preparat Combelen firmy Bayer w dawce 1 ml i znieczulenie miejscowe.

Pozostałych 6 królików (3 srokacze niemieckie, 2 czerwone nowozelandzkie, niebieski wiedeński) stanowiły grupę kontrolną.

Pomiędzy 9—18 dniem od zabiegu operacyjnego od wszystkich 21 samców pobrano po 10 ejakulatów w odstępach 2—4 dni i poddano ocenie wstępnej oraz badaniom uzupełniającym, w tym biochemicznym (GGTP/AP, AspAT). Po 2 lub 2,5 miesiącach od wprowadzenia AgNO_3 do gruczołów pęcherzykowych usuwano je chirurgicznie w celu wykonania badań histopatologicznych. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej ustalając istotność różnic między średnimi wartościami wybranych wskaźników nasienia w poszczególnych etapach doświadczenia. Porównanie średnich przeprowadzono w oparciu o test t-Studenta na poziomie istotności $\alpha \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

Właściwości nasienia królików przed i po wyłączeniu wydzieliny gruczołów pęcherzykowych (pierwsza i druga grupa doświadczalna) przedstawiono w tab. 1 i 2. Natomiast w tab. 3 podano wartości dla nasienia 6 królików grupy kontrolnej.

Po zniszczeniu nabłonka wydzielniczego gruczołu pęcherzykowego przy pomocy 2% AgNO_3 , stwierdzono zmniejszenie objętości frakcji płynnej o około 20% i wyłączenie frakcji śluzowo-galaretowatej z nasienia. Wraz ze zmniejszeniem objętości ejakulatu rośnie koncentracja plemników w jednostce objętości frakcji płynnej. Zanotowano spadek aktywności GGTP, AP i AspAT w ejakulatach wszystkich 8 królików po wyłączeniu wydzieliny gruczołów pęcherzykowych (grupa doświadczalna), jak również w nasieniu królików grupy kontrolnej (tab. 1, 3).

Obraz histologiczny ściany gruczołów pęcherzykowych, pobranych do badań po 2 miesiącach od wprowadzenia do nich 2% AgNO_3 , przedstawiał destrukcję nabłonka ze złuszczeniem się i wpadaniem go do światła, przerost łącznotkankowej warstwy właściwej błony śluzowej oraz naciekii zapalne wraz z silnym rozrostem włókien łącznotkankowych w przydancie gruczołu. Obserwowano także w warstwie właściwej błony śluzowej liczne drobne krwotoki oraz skupiska

*) Praca zrealizowana w ramach problemu MR.II.10.

Tab. 1. Właściwości nasienia królików przed i po wyłączeniu gruczołów pęcherzykowych za pomocą 2% AgNO₃ ($\bar{x} \pm s$)

Oznaczone parametry	Przed zabiegiem (n=8)	Po zabiegu (n=8)
Liczba ejakulatów	80	80
Objętość płynnej frakcji ejakulatów w cm ³	0,95 ±1,20	0,75 ±1,15
Objętość śluzowo-galaretowatej frakcji ejakulatu w cm ³	1,47 ±1,75	0
Barwa	biała do szaro-białej	biała do szaro-białej
Konsystencja płynnej frakcji ejakulatu	wodnista do śmietanowatej	wodnista do śmietanowatej
Procent plemników o ruchu prawidłowym	60 ±40	55 ±35
Koncentracja tys./mm ³	399,6 ±525,3	424,0 ±620,1
Wtórne zmiany plemników w %	4,7 ±6,2	7 ±7,1
Pierwotne zmiany plemników w %	2,3 ±3,1	2,2 ±2,8
GGTP w j.m./100 cm ³	14 605 ±8233	8141 ±5343
AspAT w j.m./100 cm ³	139,11 ±75,22	99,65 ±63,23
Fosfataza alkaliczna w j.m./100 cm ³	4613 ±3233	3735 ±2584

hemosyderyny. Nabłonek wyścielający światło badanych gruczołów pęcherzykowych morfologicznie wykazywał cechy nabłonka nieczynnego.

Próby wykluczenia wydzieliny gruczołów pęcherzykowych przy użyciu 4% AgNO₃ spowodowały zmniejszenie objętości frakcji płynnej ejakulatu o ponad 53%. U trzech królików spośród 7 wyłączona została frakcja śluzowo-galaretowata ze składu ejakulatów, zaś u pozostałych czterech obserwowano zanik wspomnianej frakcji w okresie 1—2 miesięcy od czasu wykonania zabiegu. Również ze zmniejszeniem objętości ejakulatu wzrastała koncentracja plemników we frakcji płynnej ejakulatu oraz nastąpiło nieznaczne zmniejszenie odsetka plemników poruszających się ruchem prawidłowym. Morfologia plemników w obu grupach doświadczalnych nie wykazała odchyłań od normy, a odsetek zmienionych komórek płciowych męskich mieścił się w dopuszczalnych granicach. Po wyłączeniu wydzieliny gruczołów pęcherzykowych ze składu nasienia przy pomocy 4% AgNO₃ nie stwierdzono istotnych zmian w średniej aktywności GGTP i AP w porównaniu ze stanem wyjściowym. Istotny spadek aktywności tych enzymów wykazano jedynie u królików, u których brak było frakcji śluzowo-galaretowatej w nasieniu. Natomiast poziom AspAT obniżył się w ejakulatach wszystkich królików po zabiegu operacyjnym (również w grupie kontrolnej). Stopniowe obniżenie aktywności AspAT w spermie wszystkich 21 królików doświadczalnych i kontrolnych można tłumaczyć regularną eksploatacją samców (2 ejakulatory tygodniowo w okresie od miesiąca lutego do czerwca) lub też wpływem czynników środowiska zewnętrznego, warunkujących sezonowość w rozrodzie u tego gatunku zwierząt. Interpretacja aktywności pozostałych badawczych (GGTP i AP) w opisanym materiale badawczym jest bardzo trudna, gdyż do badań użyto stosunkowo małej liczby królików w danej grupie (6—8 sztuk).

Otrzymane wyniki wskazują na decydujące znaczenie gruczołów pęcherzykowych u królika w produkcji frakcji śluzowo-galaretowatej ejakulatu. Mają one także pewien wpływ na objętość frakcji płynnej nasienia. Pojawienie się wydzieliny galaretowatej w nasieniu samców w przedziale 1—2 miesięcy po podaniu 4% AgNO₃ związane jest ze stopniem uszkodzenia ściany gruczołów pęcherzykowych. W obrazie histologicznym tego odcinka układu płciowego, pobranego do badań po 2,5 miesiąca od zabiegu operacyjnego, stwierdzono różnego stopnia zanik prawidłowego utkania tkanki gruczołowej od miernej, poprzez

częściową do całkowitej atrofii. U samców, które nie produkowały frakcji śluzowo-galaretowatej nabłonek uległ znacznemu spłaszczeniu i zanikowi, a na jego powierzchni były widoczne resztki obumarłej tkanki gruczołowej. W głębszych partiach tkanki gruczołowej, która jeszcze nie uległa martwicy, spotykano rozległe skupiska czarnego barwnika, odpowiadające złogom soli srebra. W miejscu zanikłej tkanki gruczołowej notowano silny rozrost tkanki łącznej włóknistej. W preparatach z gruczołów pęcherzykowych samców, które po pewnej przerwie zaczęły produkować ponownie frakcję galaretowatą, zaznaczał się jedynie częściowy zanik nabłonka wydzielniczego bez charakterystycznego rozplemienia tkanki łącznej włóknistej. Powyższe wyniki badań, dotyczące nasienia przed i po zabiegu operacyjnym, nie nadają się do obliczeń statystycznych ze względu na odchylenia standardowe, przekraczające często wartości średnie w poszczególnych etapach doświadczenia.

Właściwości nasienia badanych rasowych królików (tab. 1, 2, 3) nie odbiegają od norm ustalonych dla tych zwierząt. Wcześniej przeprowadzone własne obserwacje na 50 królikach różnych ras i w różnym wieku wykazały, że objętość plemnikowej frakcji nasienia wynosi 0,1—3,5 ml, średnio 0,9 ml (3). Śluzowo-galaretowata frakcja ejakulatu występowała jedynie u 42,5% królików, przy czym jej objętość wahała się od 0,2 do 3,5 ml, średnio 0,83 ml. Różnice ilościowe dotyczące omawianych frakcji nasienia mogą być związane z rasą badanych zwierząt, nie wykluczając indywidualnych właściwości poszczególnych samców. W porównaniu z ejakulatami królików rasy białej, czerwonej nowozelandzkiej i czarnej podpalanej, duże objętości frakcji plemnikowej ejakulatu (średnio 1,5 ml) otrzymano od srokaczy niemieckich. Frakcję galaretowatą o objętości 0,1—2,8 ml (4) oddawało 56% rasowych reproduktorów. W doświadczeniu wszystkie samce (21 sztuk) zostały wyselekcjonowane w kierunku obecności tej ostatniej frakcji. Wydaje się, że odruch ejakulacji jest charakterystyczną cechą osobniczą u omawianych gryzoni, uwarunkowaną genetycznie.

Adams (1) pobierał nasienie od królików średniej rasy białej nowozelandzkiej i czerwonej, uzyskując przeciętnie 0,8 ml nasienia (bez masy galaretowatej), co jest zgodne z obserwacjami Dubiela i wsp. (4). Zdaniem Götzego (7) objętość ejakulatu tych gryzoni waha się od 0,4 do 2 ml, przeciętnie 0,7 ml. Pobieranie ejakulatów w krótkich odstępach czasu powoduje wyraźne zmniejszenie się objętości ejakulatów (3,

Tab. 2. Właściwości nasienia królików przed i po wyłączeniu wydzieliny gruczołów pęcherzykowych za pomocą 4% AgNO₃ ($\bar{x} \pm s$)

Oznaczone parametry	Przed zabiegiem (n=7)	Po zabiegu (n=7)
Liczba ejakulatów	140	122
Objętość frakcji płynnej ejakulatów w cm ³	1,5 ± 1,3	0,7 ± 1,1
Objętość frakcji śluzowo-galaretowatej ejak. w cm ³	0,7 ± 1,2	0,9 ± 1,3
Barwa	biała, szaro-biała	biała, szaro-biała, brązowa
Konsystencja płynnej frakcji ejakulatu	mleczna do wodnistej	śmietanowata do wodnistej
Procent plemników o ruchu prawidłowym	45 ± 50	38 ± 45
Koncentracja plemników w tys./mm ³	433,5 ± 596	576,3 ± 625
Wtórne zmiany plemników w %	4,9 ± 6,8	2,4 ± 2,8
Pierwotne zmiany plemników w %	1,9 ± 2,3	1,5 ± 3,6
GGTP w j.m./100 cm ³	9964 ± 8235	10 506 ± 15 265
AP w j.m./100 cm ³	3080 ± 4284	2606 ± 3238
AspAT w j.m./100 cm ³	218,91 ± 240	132,51 ± 150

12). Oceniając wpływ częstości pobierania na niektóre czynności dodatkowych gruczołów płciowych u królików Kohlström (cyt. 8) wykazał, że objętość ejakulatów łącznie z frakcją galaretowatą jest największa przy pobieraniu nasienia co drugi dzień. Krystiev oraz inni (7, 8, 10, 11) donoszą, że objętość nasienia tych gryzoni wynosi zazwyczaj 0,7—0,8 ml.

Nasienie królików użytych do doświadczeń zawierało 10—70% plemników o ruchu prawidłowym, co jest zgodne z wcześniej przeprowadzonymi obserwacjami (3, 4). Duże wahanie w tym zakresie dotyczące ejakulatów pobieranych od tego samego samca w odstępach kilkudniowych należy tłumaczyć znaczną wrażliwością plemników tego gatunku na szok chłodowy. Zanotowano jednak duże różnice rasowe (4). Odsetek plemników z ruchem prawidłowym u czarnych podpalanych i czerwonych nowozelandzkich wahał się w granicach 30—70%, natomiast u białych nowozelandzkich i srokaczy niemieckich 60—90%. Według Krystiewa i wsp. (7) w nasieniu królików znaj-

duje się średnio 75% plemników o ruchu prawidłowym. Stwierdzono bardzo duże rozrzuty wyników w zakresie koncentracji plemników w nasieniu (tab. 1, 2, 3). Zjawisko to występowało nie tylko pomiędzy ejakulatami osobników różnych ras, ale także między ejakulatami samców w tej samej rasie. Liczba plemników w 1 mm³ nasienia wahała się od 57 tys. do 2 milionów, co znajduje potwierdzenie w piśmiennictwie (3, 4, 7, 8, 10, 11, 12). Wykazano również genetyczny (rasowy) charakter występowania anomalii pierwotnych i wtórnych plemników w nasieniu królików, czego dowodem był najwyższy procent zmian u czerwonych nowozelandzkich i czarnych podpalanych, a najniższy u białych nowozelandzkich (4). Autorzy pracy potwierdzili wyniki otrzymane przez Mukherjee i wsp. (9), iż część galaretowata wytrysku jest wydzielina pęcherzyków nasiennych. Brak natomiast w dostępnej literaturze danych na temat udziału wydzieliny tego dodatkowego gruczołu płciowego w części płynnej ejakulatu.

Tab. 3. Właściwości nasienia królików przed i po wyłączeniu wydzieliny gruczołów pęcherzykowych — grupa kontrolna ($\bar{x} \pm s$)

Oznaczone parametry	Przed zabiegiem (n=6)	Po zabiegu (n=6)
Liczba ejakulatów	60	60
Objętość płynnej frakcji ejakulatów w cm ³	0,78 ± 0,72	0,76 ± 0,65
Objętość śluzowo-galaretowatej frakcji ejakulatu w cm ³	0,95 ± 0,83	0,45 ± 0,43
Barwa	biała do szaro-białej	biała do szaro-białej
Konsystencja płynnej frakcji ejakulatu	wodnista do śmietanowatej	wodnista do śmietanowatej
Procent plemników o ruchu prawidłowym	60 ± 50	55 ± 45
Koncentracja tys./mm ³	461 ± 560,0	463 ± 580,0
Pierwotne zmiany plemników w %	3,9 ± 5,2	4,5 ± 4,8
Wtórne zmiany plemników w %	11,5 ± 13,0	12,9 ± 16,0
GGTP w j.m./100 cm ³	8495 ± 548	6483 ± 433
AspAT w j.m./100 cm ³	150,3 ± 83,0	70,3 ± 54,3
Fosfataza alkaliczna w j.m./100 cm ³	5646 ± 3945	5167 ± 3543

Spośród oznaczanych wskaźników nasienia królików na szczególną uwagę zasługuje wysoka aktywność GGTP (średnio 8496—14 605 j.m.). Jest ona niższa w porównaniu z poprzednimi wynikami badań nad aktywnością tego enzymu w ejakulatach królików przed wyłączeniem wydzielin jąder, najądrzy i nasieniowców (6).

Charakterystyczną cechą ejakulatów królików jest wysoka aktywność fosfatazy zasadowej w frakcji płynnej nasienia, co stwierdzono w poprzednich (5489 j.m./100 ml) i obecnych doświadczeniach (3080—5646 j.m./100 ml). Również aktywność GGTP kształtowała się na wysokim poziomie (8495 ± 548 j.m. w 100 ml). Należy podkreślić dużą zmienność otrzymanych wyników dla GGTP i AP i AspAT nasienia królików. Różnice te występowały nie tylko między ejakulatami poszczególnych osobników, ale także dotyczyły nasienia pobranego w odstępach 2—4-dniowych od tego samego zwierzęcia. Dubiel i wsp. (6) udowodnili, że głównym źródłem aktywności powyższych enzymów w nasieniu tych gryzoni jest wydzielina jąder i najądrzy. Wyłączenie wydzieliny nasieniowców powoduje jedynie wyraźne obniżenie aktywności AspAT. Powyższe wyniki należy oceniać bardzo ostrożnie, ponieważ po podaniu 4% AgNO₃ stwierdzono w obrazie histologicznym różnego stopnia atrofie tkanki gruczołowej. Utrzymujące swoją wydzielniczość nie uszkodzone partie gruczołu pęcherzykowego mogły wpłynąć na układ wyników w przedstawionej tabeli nr 2. Obecnie trwają badania nad możliwością chirurgicznego usunięcia dodatkowych gruczołów płciowych w celu całkowitego wyłączenia ich wydzieliny ze składu nasienia.

Wnioski

1. Wytwarzanie frakcji śluzowo-galaretowatej nasienia odbywa się u królika głównie w gruczole pęcherzykowym.

2. Możliwy jest również udział wydzieliny gruczołu pęcherzykowego w produkcji frakcji płynnej ejakulatu.

3. Charakterystyczną cechą ejakulatów królików jest bardzo wysoka aktywność GGTP i fosfatazy zasadowej, natomiast znacznie niższa aktywność AspAT. Zaznaczała się jednak duża zmienność w poziomie tych enzymów, dotycząca tych samych i różnych osobników.

Piśmiennictwo

1. Adams C. E.: Nature (Lond.) 180, 853, 1957.
2. Dubiel A.: Medycyna Wet. 29, 624, 1973.
3. Dubiel A.: Arch. vet. Pol. 17, 707, 1974.
4. Dubiel A., Króliński J., Karpiakowa Cz.: Medycyna Wet. 35, 175, 1979.
5. Dubiel A., Króliński J., Karpiakowa Cz.: Medycyna Wet. 38, 608, 1982.
6. Götz R.: Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugtiere. Verlag Schaper, Hannover, 1949.
7. Krystiev A., Radev G., Danov D.: Nauč. Trudove, Vyss. Selskostop. Inst. „Georgi Dimitrov”, Zootechn. fak. 13, 135, 1963.

8. Maule J. P.: The semen of animal, and artificial insemination. CAB, 1962.
9. Mukherjee D. P., Johari M. P., Bhattacharya P.: Nature (Lond.) 160, 422, 1951.
10. Naibandov A. V.: Fizjologia rozrodu. PWN, 1966.
11. Příbyl E.: Veterinární porodnictví. Státní zdravotnické Nakl. 1954.
12. Weitze K. F.: Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma. Praca hab. Wyższa Szkoła Weterynaryjna, Hanower, 1977.

Adres autora: doc. dr habil. Andrzej Dubiel, plac Grunwaldzki 6A/18, 50-384 Wrocław

Дубель А., Крулиньский Я., Карпьяк Ч., Мадей Я.
— Свойства семени кроликов до и по исключении секрета пузырьковидной железы

Исследования имели целью показание свойств семени кроликов-самцов по исключении секрета пузырьковидной железы путем уничтожения его секреторного эпителия при помощи AgNO₃.

Для наблюдения использовали эякуляты 21 кролика. Животных разделили на 3 группы. Самцы I (8 голов) и II (7 голов) ввели в пузырьковидные железы — 0 (I группа) и 4% AgNO₃ (II группа) в количестве 1—2 мл. Остальных 6 животных являлось контрольной группой.

Отметили, что пузырьковидная железа кролика решает о продукции слизисто-желеобразной фракции семени. Возможно также участие ее секрета в продукции жидкой фракции эякулята. Характерной чертой эякулятов кроликов является очень высокая активность GGTP и щелочной фосфатазы, зато значительно меньшая активность AspAT.

Dubiel A., Króliński J., Karpiak Cz., Madej J. — Properties of rabbit's semen before and after removing of the vesicular gland secretion

The aim of the studies was to establish the properties of rabbit's semen after removing the vesicular gland secretion by destruction of the vesicular gland epithelium using AgNO₃. The studies were performed with ejaculates of 21 rabbits in 3 experimental groups. The animals of the first group (8 rabbits) and the second group (7 animals) were given directly into the vesicular gland 2.0% and 4.0% solution of AgNO₃ (1—2 ml), respectively. Control group (6 rabbits) was not treated.

It was found that the vesicular gland plays a decisive role in production of muco-gelatinous fraction of semen. Secretion of this gland may also take part in production of a liquid fraction of ejaculate. Characteristic for ejaculate of rabbits is a very high activity of GGTP and alkaline phosphatase and significantly lower activity of AspAT.

FIELD E. W., SMITH M. H.: Odpowiedź komórkowa bydła na wirus syncycjalny układu oddechowego. (Cell mediated immune response in cattle to bovine respiratory syncytial virus). Am. J. vet. Res. 45, 1641—1643, 1984 (8).

Po donosowym zakażeniu cieląt wirusem syncycjalnym układu oddechowego bydła (BRV) występuje alergja typu późnego. Odczyn zahamowania migracji leukocytów wypada dodatnio począwszy od 5 dnia po zakażeniu, osiąga maksymalne nasilenie 21 dnia i utrzymuje się do 42 dnia po zakażeniu.