

Golnika i wsp. (9) u 2 źrebiąt padłych w wyniku zakażenia spontanicznego. Można by zatem przypuszczać, że rozległość i zaawansowanie zmian naczyniowych przy EVA jest uzależnione od wielu czynników, zapewne jeszcze całkowicie nie wyjaśnionych. Napewno należy brać pod uwagę indywidualną wrażliwość organizmu na czynniki zewnętrzne i wewnętrzne, stopień nasilenia infekcji oraz zjadliwość wirusa. O nasileniu zmian decyduje również czas trwania choroby, na co zwrócili uwagę w swych badaniach Crawford i wsp. (4). Należy też nadmienić, że u koni doświadczalnie zakażanych, najbardziej rozległe i rozwinięte zmiany w naczyniach pojawiały się dopiero w późnym okresie rekonwalescencji, gdy we krwi występowały już przeciwciała (14). Może to sugerować, że EVA jest chorobą kompleksów immunologicznych, podobnie jak *periarteritis nodosa*, *lupus erythematosus* i *morbis seri* (choroba posurowicza), występujące głównie u człowieka.

Podsumowując wyniki powyższych badań płodów końskich można przyjąć, że zmiany sekcyjne i mikroskopowe narządów przy EVA, nie są na tyle charakterystyczne aby stanowiły podstawę do diagnozowania ronień. Również zmiany naczyniowe występujące tylko w ok. 30% przypadkach, są mało uchwytne i wymagają

doświadczenia histopatologicznego w tym zakresie. Stąd też zawsze rozstrzygające będzie rozpoznanie wirusologiczne. Badania morfologiczne płodów są tylko cennym uzupełnieniem całokształtu badań nad wirusowym zapaleniem tętnic koni.

Piśmiennictwo

1. Brion A., Fontaine M., Moraillon R.: Recl. Med. Vet. 143, 17, 1967.
2. Colnoul F. L., Chevill N. F.: Vet. Pathol. 21, 333, 1984.
3. Cole J. R., Hall R. F., Gosser H. S., Hendricks J. B., Pursell A. R., Senne D. A., Pearson J. E., Gipson C. A.: J. Am. Vet. Med. Ass. 189, 769, 1986.
4. Crawford T. B., Henson J. B.: Proc. 3-rd Int. Conf. Equine Infect. Dis., Paris 1972, Karger, Basel 1973, s. 232.
5. Doll E. R., Bryans J. T., McCollum W. H., Crowe M. E. W.: Cornell Vet. 47, 3, 1957.
6. Doll E. R., Knappenberger R. E., Bryans J. T.: Cornell Vet. 47, 69, 1957.
7. Estes P. C., Chevill N. F.: Am. J. Pathol. 58, 235, 1970.
8. Golnik W., Michalak T.: Medycyna Wet. 35, 665, 1979.
9. Golnik W., Michalska Z., Michalak T.: Schweizer Arch. Tierheil. 123, 523, 1981.
10. Golnik W., Moraillon A., Golnik J.: J. Vet. Med. B, 33, 413, 1986.
11. Golnik W.: Bull. Six Int. Conf. Equine Infect. Dis., Cambridge 1991, s. 82.
12. Johnson B., Baldwin C., Timoney P., Ely R.: Vet. Pathol. 28, 248, 1991.
13. Jones T. C., Doll E. R., Bryans J. T.: Cornell Vet. 47, 52, 1957.
14. Prickett M. E., McCollum W. H., Bryans J. T.: Proc. 3-rd Int. Conf. Equine Infect. Dis., Paris 1972, Karger, Basel 1973, s. 265.

Adres autora: prof. dr hab. Zofia Michalska, ul. Żaka 24, 51-640 Wrocław

KRZYSZTOF BORKOWSKI, JADWIGA TORSKA, JERZY STRZEŻEK

Wpływ częstotliwości ejakulacji na jakość nasienia oraz mechanizmy zabezpieczające układ rozrodczy tryka przed proteolizą

Katedra Biochemii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR-T,
ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

Summary

The effect of ejaculation frequency on semen quality and the mechanism protecting ram reproductive system against proteolysis

Four rams of Polish long-wool sheep were intensively used in course of one year in an experimental scheme: 10 periods of semen collection, 10 ejaculation daily for 10 consecutive days in each period.

It was found that the concentration and number of spermatozoa decreased significantly in the last (10th) ejaculates compared to the first ones. Apart from these qualitative changes connected with intensive use of the animals, it was also noted that the season of semen collection affected semen quality. The highest concentration and number of spermatozoa was observed in the ejaculates collected during the period November-March, the lowest ejaculate volumes were recorded in spring, whereas percentage of spermatozoa with damaged acrosomes was noticeably higher in July and August.

Increased frequency of ejaculation was connected with possibly lower share of epididymis secretion in the ejaculate. This resulted in considerable decrease of the activity of plasmatic proteinase inhibitors in the last (10th) ejaculates.

Studies showed that changes in the inhibitor activity in ram seminal plasma in the annual cycle were caused by variations in the intensity of secretion of these substances, as well as bonding of the inhibitors by proteinase liberated from damaged acrosomes. Intensive sexual exploitation of rams may lead to some disturbances in the system protecting seminal proteins against unspecific proteolysis.

owiec. Zachowanie płciowe i produkcja nasienia u tryka stymulowane są skracaniem długości dnia świetlnego (3, 4, 6, 7, 8). Omawiane zjawisko występuje niezależnie od rasy i przebiega podobnie w naturalnych warunkach świetlnych, jak i przy stosowaniu kontrolowanych, sztucznych cykli świetlnych (3, 5, 6, 7, 8). Z powyższych względów poznanie mechanizmów warunkujących sezonowe zmiany aktywności nabłonka plemnikotwórczego u tryka, z uwzględnieniem wpływu częstotliwości ejakulacji na właściwości biologiczne i zdolność zapładniającą nasienia tego gatunku zwierząt, ma szczególnie istotne znaczenie.

Jennings i McWeeney (cyt. 1) stwierdzili, że liczba plemników w ósmym z kolejno uzyskanych ejakulatów może obniżyć się do poziomu uniemożliwiającego zapłodnienie komórki jajowej, natomiast Amir i wsp. (1) nie obserwowali wpływu zwiększonej częstotliwości ejakulacji na płodność tryków. Badania Udały i wsp. (15) wskazują na występowanie zauważalnej sezonowości dotyczącej jakości nasienia polskich ras tryków.

Celem pracy było określenie wpływu intensywnej eksploatacji płciowej tryka na właściwości biologiczne nasienia.

Materiał i metody

W doświadczeniu przeprowadzonym w cyklu rocznym uwzględniono dziesięć 10-dniowych serii pobierania nasienia oraz 20- i 40-dniowe przerwy w użytkowaniu zwierząt (tab. 1). Nasienie pobierano przy użyciu sztucznej pochwy od 4 tryków rasy polska owca długowłosa w wieku 3-4 lat, po 10 ejakulatów od każdego zwierzęcia w kolejnych dniach serii. W czasie doświadczenia tryki utrzymy-

Użytkowanie rozplodowe tryka w ciągu całego roku stanowi podstawowy problem w intensywnym chowie

Tab. 1. Schemat doświadczenia

Seria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Okres badań	7—16 III	6—15 IV	6—15 V	27.VI 6.VII	27.VII 5.VIII	26.VIII 4.IX	15—24 X	14—23 XI	12—21 XII	31.I 9.II
Przerwy w użytkowaniu (dni)	20	20	40	20	20	40	20	20	40	

Tab. 2. Wpływ intensywnej eksploatacji płciowej tryka w cyklu rocznym na badane wskaźniki jakości i parametry biochemiczne nasienia

Seria miesiąc	Miary statystyczne	Objętość ejakulatu cm ³		Koncen- tracja płemników mld/cm ³		Liczba płemników w ejakulacie mld		Uszkodze- nia akro- somów %		Aktywność inhibitorów proteinaz w plazmie IU/cm ³		Zawartość białka w plazmie mg/cm ³	
		Ejakulatory											
		I	X	I	X	I	X	I	X	I	X	I	X
1 (III)	n $\bar{x}$ s	20 0,46 0,35	20 0,3 0,18	20 3,22 1,05	20 1,77 0,65	20 1,44 1,33	20 0,63 0,57	20 4,6 2,14	20 5,37 2,11	20 25,14 7,02	14 14,29 7,68	20 36,6 8,44	14 26,8 14,9
2 (IV)	n $\bar{x}$ s	20 0,49 0,42	16 0,40 0,30	20 2,92 0,95	16 1,85 0,88	20 1,72 1,50	16 0,99 1,34	20 3,35 1,81	16 6,88 3,57	20 19,44 9,84	13 17,84 11,65	20 34,2 9,80	13 24,3 16,2
3 (V)	n $\bar{x}$ s	20 0,54 0,31	14 0,36 0,18	20 2,54 0,99	14 1,87 1,07	20 1,39 1,25	14 0,69 0,85	20 5,75 2,36	14 7,19 2,46	20 21,84 10,82	12 10,01 7,12	20 44,5 13,2	12 34,3 15,5
4 (VI/VII)	n $\bar{x}$ s	17 0,51 0,40	13 0,38 0,16	17 2,06 1,04	13 1,33 0,92	17 1,17 1,35	13 0,52 0,33	17 6,44 3,60	13 6,85 4,71	15 26,14 9,27	13 15,39 9,7	15 54,8 7,2	13 45,1 9,0
5 (VII/VIII)	n $\bar{x}$ s	20 0,46 0,34	16 0,39 0,23	20 1,73 1,11	16 1,52 0,73	20 0,89 1,21	16 0,56 0,54	16 10,6 3,86	13 9,3 4,53	18 11,67 8,27	14 10,61 5,71	18 49,8 15,5	14 37,4 8,76
6 (VIII/IX)	n $\bar{x}$ s	20 0,57 0,28	8 0,64 0,18	20 2,42 1,30	8 1,40 0,55	20 1,40 1,45	8 0,76 0,59	16 9,88 2,16	7 10,1 2,83	16 15,15 10,13	6 16,39 13,93	16 34,4 9,06	6 30,0 10,0
7 (X)	n $\bar{x}$ s	20 0,51 0,31	15 0,51 0,20	20 2,96 1,50	15 1,41 0,67	19 1,41 1,16	14 0,86 0,73	16 7,69 4,01	10 5,80 2,62	17 19,39 5,78	13 15,21 4,97	17 39,0 13,7	13 30,8 10,5
8 (XI)	n $\bar{x}$ s	20 0,56 0,27	16 0,62 0,22	20 2,68 1,38	16 1,52 0,44	20 1,53 1,52	16 0,95 0,59	18 7,50 6,07	13 4,76 2,77	19 24,29 12,97	15 14,38 8,20	19 27,5 13,2	15 17,2 7,69
9 (XII)	n $\bar{x}$ s	19 0,53 0,29	10 0,50 0,25	19 3,05 1,44	10 1,89 0,74	19 1,66 1,01	10 1,13 0,84	19 3,79 3,44	10 4,00 2,67	19 14,99 10,30	10 12,18 7,25	19 28,4 11,3	10 22,6 17,2
10 (I/II)	n $\bar{x}$ s	20 0,52 0,32	10 0,43 0,12	20 3,03 1,56	10 2,12 0,63	17 1,96 1,73	9 0,93 0,44	16 5,50 4,46	9 4,22 2,04	14 27,70 12,00	6 21,37 6,07	14 35,4 20,7	6 32,2 16,5
RAZEM	n $\bar{x}$ s	196 0,51 0,24	138 0,45 0,21	196 2,66 0,19	138 1,67 0,77	172 1,46 1,29	136 0,82 0,40	178 6,52 2,44	125 6,45 2,04	178 20,58 10,76	142 14,78 7,38	178 38,5 16,8	116 30,1 12,7

wane były w naturalnych warunkach świetlnych i standardowym żywieniu.

W badaniach określano następujące parametry nasienia: objętość ejakulatu odczytywano z podziałki kalibrowanego zbiorniczka z dokładnością do 0,05 cm³, koncentrację plemników w 1 cm³, nasienia oznaczano metodą kolorymetryczną (2), ruchliwość tych komórek określano przy użyciu mikroskopu świetlnego stosując 5-punktową skalę, zaś przygotowanie preparatów nasienia oraz mikroskopową ocenę stanu akrosomów plemników przeprowadzano wg Watsona (16).

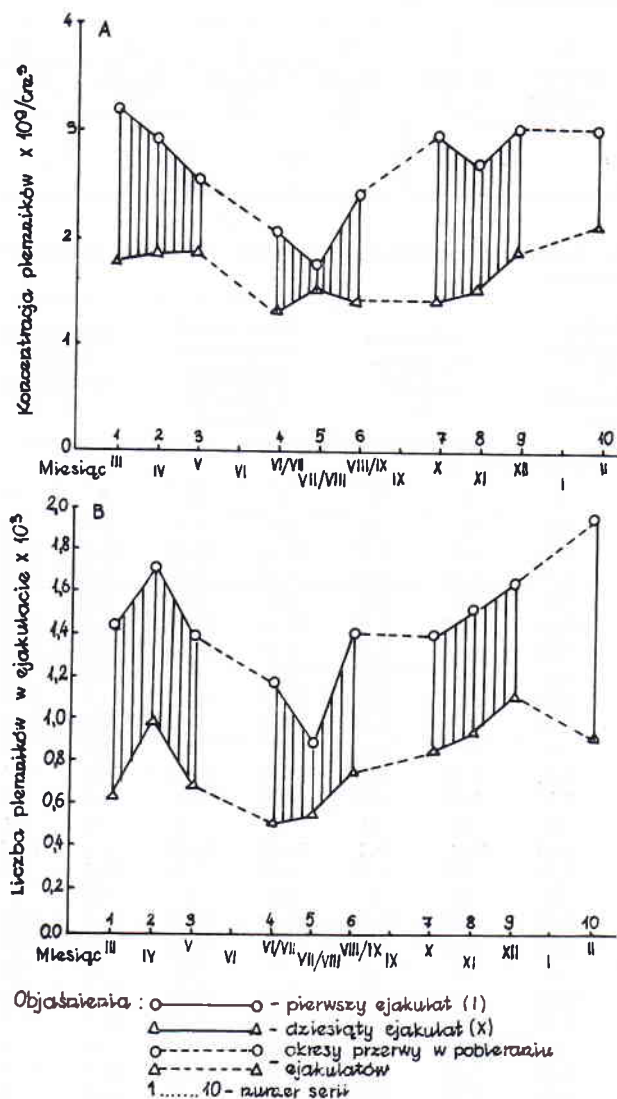
Do badań biochemicznych wykorzystano plazmę uzyskaną po dwukrotnym wirowaniu nasienia przez 20 min. w temp. 277K, odpowiednio przy 900 g i 14 700 g. Zawartość białka całkowitego w plazmie oznaczano metodą biuretową wg Weichselbauma (17). Antytrypsynową aktywność plazmowych inhibitorów proteinaz określano metodą spektrofotometryczną (11) przy użyciu spektrofotometru VSU-2P (Carl Zeiss, Jena), stosując jako substrat chlorowodorek estru etylowego α -N-benzoilo-L-argininy. Za jednostkę aktywności inhibitorowej (IU) przyjęto taką ilość inhibitora, która obniżała aktywność dwóch jednostek trypsyny o 50%. Jedną jednostką enzymu (U) katalizowała przemianę i μ M substratu w ciągu 1 min.

W przeprowadzonym doświadczeniu pobrano 3756 ejakulatów, natomiast badaniami objęto ejakulatory: pierwszy, piąty i dziesiąty uzyskane w 1, 3, 5, 8 i 10 dniu poszczególnych serii. Biorąc pod uwagę obszerny materiał doświadczalny w niniejszej pracy przedstawiono jedynie dane otrzymane dla pierwszego oraz dziesiątego ejakulatu. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono na komputerze Amstrad PC 1512 wykorzystując program Epistat, obliczając średnie arytmetyczne, odchylenie standardowe, współczynnik zmienności i istotność różnic (wskaźnik Pearsona) oraz współczynnik korelacji (test t-Studenta).

Wyniki i omówienie

Średnie wartości oznaczanych wskaźników jakości oraz parametrów biochemicznych nasienia tryka przedstawiono w tab. 2 oraz na ryc. 1, 2 i 3.

Stwierdzono 30–55%, obniżenie koncentracji plemników oraz liczby tych komórek w ejakulatach objętych analizą statystyczną (tab. 2, ryc. 1). Wykazano ponadto zakłócenia dotyczące ilościowego udziału w składzie ana-

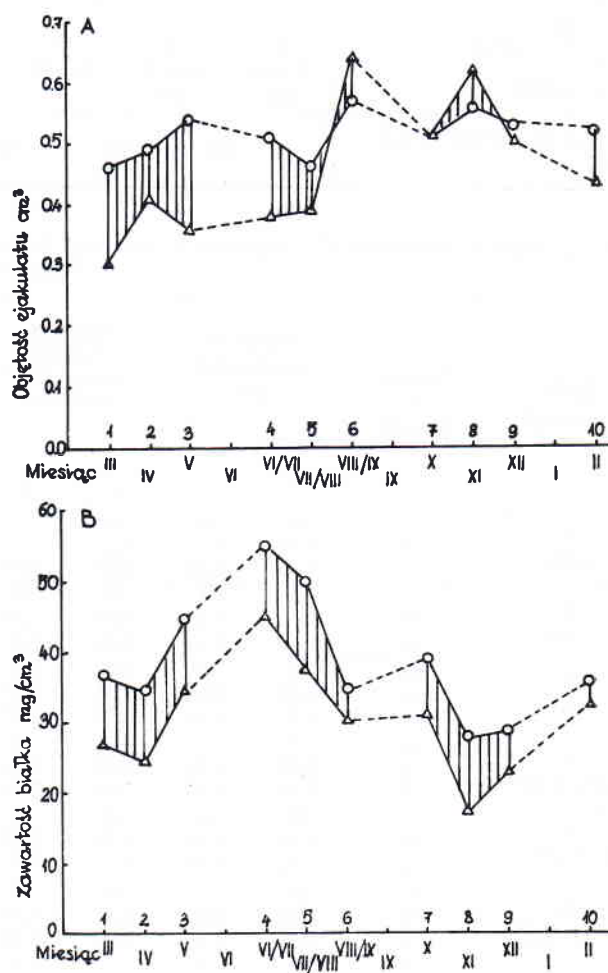


Ryc. 1. Wpływ intensywnej eksploatacji płciowej tryka w cyklu rocznym na koncentrację (A) oraz liczbę plemników w ejakulacie (B)

lizowanych ejakulatów wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych w stosunku do wydzielin jąder i najądrzy. Zjawisko powyższe przejawiało się istotnym obniżeniem aktywności plazmowych inhibitorów proteinaz (tab. 2, ryc. 3B) wydzielanych głównie przez najądrza (13).

Niezależnie od zmian ilościowych nasienia uwarunkowanych częstotliwością ejakulacji, obserwowano istotny wpływ pory roku na analizowane wskaźniki. Najwyższą koncentrację i liczbę plemników w pierwszych i dziesiątych ejakulatach stwierdzono w okresie listopad—marzec, najniższą zaś w lipcu i sierpniu (tab. 2, ryc. 1A i 1B), natomiast obniżenie objętości ejakulatów obserwowano w sezonie wiosennym (ryc. 2A). Nie wykazano istotnych zmian w ruchliwości plemników zależnych od pory roku.

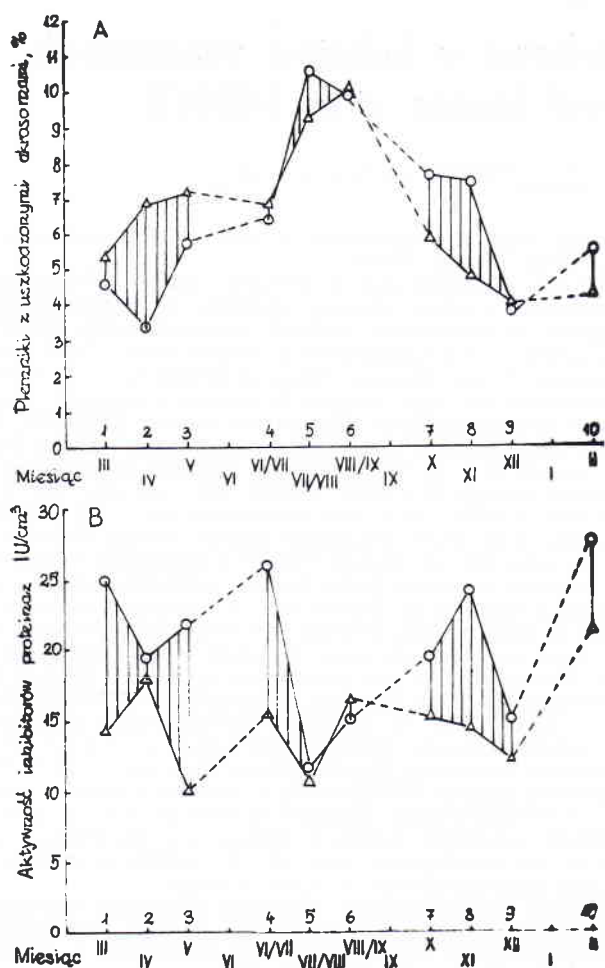
Zjawisko dominacji wpływu sezonu nad intensywnością użytkowania rozplodowego tryków na wskaźniki jakości nasienia obserwowali również Amir i wsp. (1). Wymienieni autorzy stwierdzili, że niezależnie od częstotliwości ejakulacji najwyższym odsetkiem morfologicznie zmienionych plemników charakteryzuje się nasienie uzyskane w marcu oraz listopadzie i grudniu. Badania Amira i wsp. (1) wskazują ponadto na zależność nasilenia uszkodzeń poszczególnych struktur mor-



Ryc. 2. Zmiany objętości ejakulatu (A) oraz zawartości białka całkowitego w plazmie nasienia tryka w cyklu rocznym. Objasnienia jak na ryc. 1.

fologicznych plemnika od pory roku: w marcu przeważają zmiany witki, w lipcu wzrasta odsetek komórek z uszkodzonymi akrosomami, natomiast w okresie sierpień—wrzesień — z kroplą protoplazmatyczną. Kropla protoplazmatyczna i akrosom są podstawowymi „zbiornikami” hydrolaz plemnika (19). W akrosomie występują głównie enzymy proteolityczne, w tym tripsynopodobny enzym — akrosyna (E C 2.4.21.10). W warunkach fizjologicznych akrosyna wspomagana przez inne hydrolazy uczestniczy w procesie zapłodnienia komórki jajowej (10). Nasilone uwalnianie tego enzymu z uszkodzonych akrosomów prowadzi do niespecyficznej proteolizy białkowych struktur plemników, jak i białek wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych (9, 14). Proces ten warunkować może zakłócenia mechanizmów regulacyjnych w nasieniu, w tym także odpowiedzialnych za zdolność męskich komórek płciowych do zapłodnienia oraz ruchu.

Obserwowane w badaniach zmiany odsetka plemników z uszkodzonymi akrosomami towarzyszące eksploatacji płciowej tryków w cyklu rocznym ilustruje tab. 2 oraz ryc. 3A. Otrzymane wyniki wskazują na statystycznie istotny wzrost tego wskaźnika zarówno w pierwszych, jak i dziesiątych ejakulatach w okresie lipiec—sierpień, w porównaniu do stwierdzonych w pozostałych miesiącach. Niezależnie od sezonowych różnic w nasileniu uszkodzeń akrosomów wzrost odsetka plemników ze zmianami tej struktury, stwierdzony w większości ejakulatów dziesiątych, sugeruje możliwość naruszenia stabilności układu rozrodczego tryka przez enzy-



Ryc. 3. Zmiany odsetka plemników z uszkodzonymi akrosomami (A) oraz aktywność plazmowych inhibitorów proteinaz (B) w nasieniu tryka w cyklu rocznym. Objasnienia jak na ryc. 1.

my proteolityczne uwolnione z akrosomów przed ejakulacją.

Funkcję naturalnego systemu ochronnego, zabezpieczającego tkanki tego układu przed proteolizą pełnią inhibitory akrosyny (proteinaz) obecne w wydzielinach gruczołów płciowych, głównie najądrzy (13). Obserwowane w badaniach zmiany aktywności tych substancji w plazmie przedstawiono w tab. 2 oraz na ryc. 3B. Zwraca uwagę fakt, że w miesiącach lipiec—sierpień, a więc w okresie szczególnego zagrożenia układu rozrodczego tryka reakcjami niespecyficznej degradacji białek, dochodzi do istotnego obniżenia aktywności plazmowych inhibitorów proteinaz, uwarunkowanego przypuszczalnie powstaniem nieczynnych kompleksów tych substancji z akrosyną „wyciekającą” z uszkodzonych plemników.

Podwyższoną aktywność inhibitorów w plazmie nasienia ejakulatów pierwszych stwierdzono w okresie maj—czerwiec, bezpośrednio poprzedzającym nasilenie uszkodzeń akrosomów plemników. Omawiane zmiany oraz towarzyszący im wzrost zawartości białka całkowitego w plazmie (tab. 2, ryc. 2B) wskazują na zwiększenie sekrecji inhibitorów w wymienionym okresie. Intensywna eksploatacja płciowa tryka prowadzi przypuszczalnie do zakłóceń w przebiegu tego procesu, bowiem w badaniach plazmy nasienia ejakulatów dziesią-

tych uzyskanych w maju i czerwcu wykazano niską aktywność omawianych substancji (zblizoną do obserwowanej w pozostałych miesiącach), mimo utrzymującego się wysokiego poziomu białka ogólnego (ryc. 2B i 3B). Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejszą sugestię o zmianach relacji ilościowych pomiędzy udziałem w składzie ejakulatów wydzielin najądrzy do pozostałych gruczołów płciowych, w przypadku zwiększonej częstotliwości ejakulacji.

Wyniki badań aktywności inhibitorowej uzyskane dla ejakulatów pierwszych są zgodne z naszymi wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi zmian w zawartości białek systemu akrosynowego w nasieniu tryka w cyklu rocznym (12). Wydaje się więc, że oznaczanie aktywności inhibitorów proteinaz w plazmie nasienia tego gatunku zwierząt stanowić może cenny wskaźnik informujący o zakłóceniach procesów stabilizujących układ rozrodczy.

Wnioski

1. Zwiększona częstotliwość ejakulacji prowadzi do istotnych zmian ilościowych w nasieniu tryka, jednakże jakość nasienia tego gatunku zwierząt zależy głównie od pory roku.

2. Inhibitory proteinaz występujące w plazmie nasienia tryka stanowią naturalny, sprawnie funkcjonujący system zabezpieczający białka nasienia przed proteolityczną degradacją.

Piśmiennictwo

- Amir D., Gacitua H., Ron M., Lehrer A. R.: *Anim. Reprod. Sci.* 10, 75, 1986.
- Bielański W.: *Rozród zwierząt*, PWRiL, Warszawa 1979.
- Boland M. B., Al-Kamali A. A., Crosby T. F., Haynes N. B., Howles C. M., Kellehrer D. L., Gordon J.: *Anim. Reprod. Sci.* 9, 241, 1985.
- Cheminau P., Delgadillo J. A., Malpoux B., Pelletier J.: *IV Intern. Cong. Andrology*, Florence 1989.
- Fiser P. S., Fairfull R. W.: *Cryobiology* 20, 684, 1983.
- Folch J.: A Seminar in the EEC Programme of Coordination of Research on Animal Production, 1984, October 6–7, Martinus Nijhoff Publishers, wyd. M. Courot, s. 141.
- Lincoln G. A., Lincoln C. E., McNeilly A. S.: *J. Reprod. Fert.* 88, 623, 1990.
- Ortavant R., Bocquier F., Pelletier J., Ravault J. P., Thimonier J., Volland-Nail P.: *Aust. J. biol. Sci.* 41, 69, 1988.
- Schiessler H., Arnhold M., Ohlson K., Fritz H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1251, 1976.
- Schill W. B., Topfer-Petersen B., Heissler B.: *Human Reproduction* 3, 139, 1988.
- Schwert G. W., Takenaka J.: *Biochim. biophys. Acta*, 16, 570, 1955.
- Strzeżek J., Świdowicz K., Torska J.: *Proc. 11th Intern. Cong. Anim. Reprod. Artific. Insem.*, Dublin, 3, 300, 1988.
- Suominen J. B., Setchell P.: *J. Reprod. Fert.* 30, 235, 1972.
- Tschesche H., Kupfer S., Klauser R., Fink E., Fritz H.: *Structure, biochemistry and comparative aspects of mammalian seminal plasma acrosin inhibitors*, w: *Protides of the Biological Fluids. Proc. 23rd Colloq.*, red. H. Peeters, Pergamon Press, New York, 1976.
- Udala J., Boryczko Z., Ordysńska L., Łopuszko B.: *Medycyna Wet.* 46, 403, 1990.
- Watson P. F.: *Vet. Rec.* 97, 12, 1975.
- Weichselbaum T. E.: *J. clin. Path.*, 10, 40, 1948.
- Zaneveld L. J. D., Polakoski K. L., Schumacher G. F. B.: *The proteolytic enzyme system of mammalian genital tract secretions and spermatozoa*, w: *Proteases and Biological Control*, wyd. E. Reich, D. Rifkin, E. Shaw, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1975.