

JAN GLOGOWSKI, JERZY STRZEŻEK

Niektóre biochemiczne właściwości fosfatazy alkalicznej podczas zamrażania nasienia buhaja*)

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

Denaturacja białek wywołana niskimi temperaturami wiąże się z obniżeniem aktywności szeregu enzymów komórkowych (6). Istotnym problemem biotechnologii zamrażania nasienia zwierząt w ciekłym azocie jest zachowanie pełnej sprawności enzymatycznej plemników oraz białek enzymatycznych plazmy nasienia. Współdziałanie bowiem tych dwóch systemów enzymatycznych decyduje o wysokiej zdolności zapładniającej plemników.

Graham i Pace (5) podali, że aktywność aminotransferazy asparaginianowej (GOT) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wzrastają silnie w płynie nadosadowym, po zamrożeniu nasienia w ciekłym azocie. Autorzy wnioskują, że zjawisko to jest spowodowane „wyciekaniem” enzymów z uszkodzonych plemników.

Określenie stopnia nasilenia „wycieku” enzymów plemnika do płynu zewnątrzkomórkowego znalazło zastosowanie jako kontrolny test uszkodzeń kriogenicznych plemników (3, 5).

Fosfataza alkaliczna należy głównie do wieloskładnikowego kompleksu enzymatycznego plazmy nasienia zwierząt. Obecność tego enzymu stwierdzono również w błonach cytoplazmatycznych plemnika (4). U buhaja, fosfataza alkaliczna występuje co najmniej w 2 formach molekularnych w plazmie nasienia oraz 2—4 formach w plemnikach (1, 4). Przypisuje się jej udział w wielu procesach biologicznych męskiego i żeńskiego układu rozrodczego (4).

Celowym wydaje się więc określenie wpływu poszczególnych etapów zamrażania nasienia buhaja w ciekłym azocie na niektóre właściwości biochemiczne fosfatazy alkalicznej.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 36 ejakulatach pobranych na sztuczną pochwę od buhajów rasy ncb użytkowanych w PZLZ w Olsztynie. Nasienie o dobrej jakości, rozszerzdzano rozcieńczalnikiem żółtkowo-cytrynianowo-fruktozowym (ŻCF) w stosunku 1:2. Zastosowano biotechnologię zamrażania powszechnie stosowaną w zakładach unasienniania zwierząt.

Obserwację zmian aktywności fosfatazy alkalicznej i ruchliwości elektroforetycznej form molekularnych przeprowadzono w plazmie nasienia (bezpośrednio po pobraniu ejakulatu) oraz w płynach nadosadowych.

Płyny nadosadowe uzyskiwano bezpośrednio po rozcieńczeniu nasienia, po 4 godz. ekwilibracji oraz 24 godz. przechowywaniu w ciekłym azocie, odwirowując nasienie 10 minut przy $10\,000 \times g$ w temperaturze $4^{\circ}C$.

Aktywność fosfatazy alkalicznej określano metodą Bessey i wsp. (2). Rozdziałów elektroforetycznych dokonano na żelu poliakrylamidowym. Formy molekularne fosfatazy alkalicznej identyfikowano metodą Seligmana i Burka (cyt. za 10) stosując beta-naftylofosforan w 0,1 M buforze weranoloowym (pH 9,1) oraz błękit trwały RR. Natomiast frakcje glikoproteinowe identyfikowano po rozdziałach elektroforetycznych stosując odczynnik Schiffa (10).

Interpretację wyników rozdziałów elektroforetycznych przeprowadzono za pomocą densitometru TLD-100 firmy Vitatron.

W badaniach immunologicznych przeprowadzono obserwację zmian właściwości antygenowych fosfatazy alkalicznej. Zastosowano podwójną dyfuzję żelową w układzie surowicy odpornościowej wobec izolowanych dwóch form molekularnych fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia a płyny nadosadowe z poszczególnych etapów zamrażania nasienia.

Wyniki i omówienie

Rezultaty analizy statystycznej aktywności fosfatazy alkalicznej w plazmie nasienia oraz po rozcieńczeniu nasienia na poszczególnych etapach zamrażania przedstawiono w tab. 1

Tab. 1. Wyniki analizy statystycznej aktywności fosfatazy alkalicznej na poszczególnych etapach obróbki technologicznej

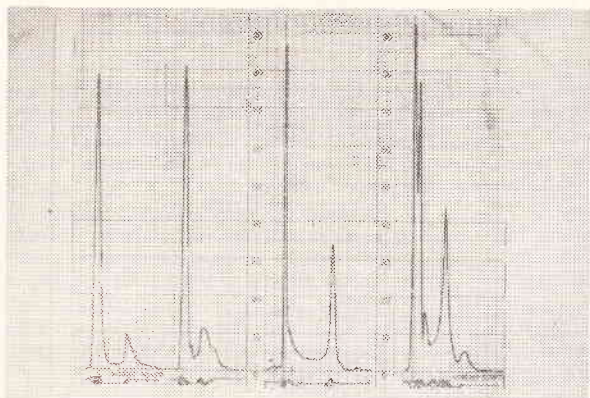
	Aktywność fosfatazy alkalicznej (J. Bessey)			
	plazma	po rozcieńczeniu	po 4 godz. ekwilibracji	po 24 godz. w $77^{\circ}K$
X	423,88	137,88	139,77	145,27
S _x	244,39	78,15	77,71	83,35
V _x	57,64%	56,68%	55,60%	57,38%

Aktywność fosfatazową po rozcieńczeniu nasienia w stosunku 1:2 rozcieńczalnikiem żółtkowo-cytrynianowo-fruktozowym jest ponad trzykrotnie niższa aniżeli w plazmie nasienia i nie ulega istotnym zmianom na pozostałych etapach technologicznych. Zwracają uwagę stosunkowo duże wartości odchylenia standardowego i współczynnika zmienności, spowodowane dużymi wahaniami aktywności fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia u poszczególnych buhajów. Bowiem w obrębie analizowanych 36 ejakulatów: aktywność do 200 jednostek Bessey stwierdzono w plazmie 5 buhajów, w przedziale 201—400 j. Bessey — u 17 osobników,

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

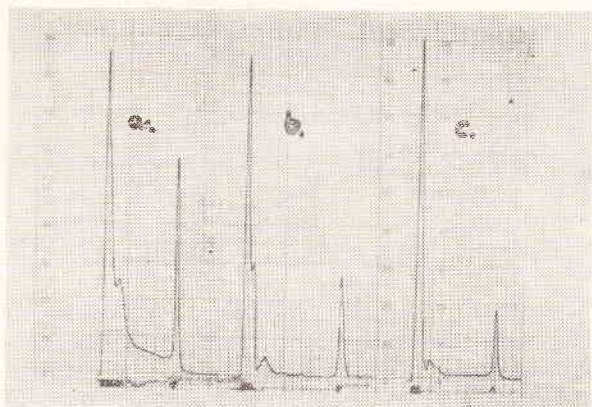
401—600 j. Bessey — u 6 osobników zaś w przedziale 601—800 j. Bessey i powyżej 800 j. Bessey u 4 osobników dla każdej wartości.

Badania elektroforetyczne wykazały zmiany profilu form molekularnych fosfatazy alkalicznej na poszczególnych etapach zamrażania nasienia. Niezależnie od liczby form molekularnych w plazmie nasienia buhajów (ryc. 1) po



Ryc. 1. Enzymogramy fosfatazy alkalicznej w plazmie nasienia buhajów

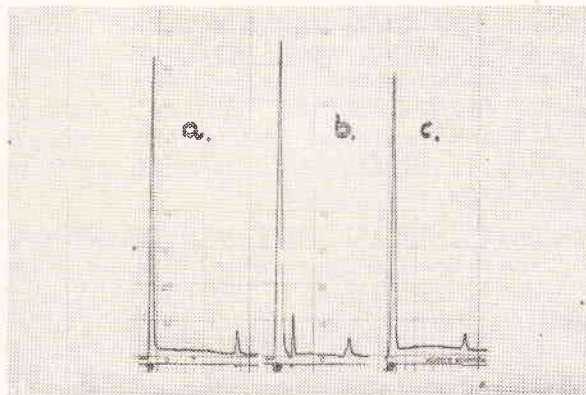
rozcieńczeniu nasienia obserwowano dwa pasma elektroforetyczne o aktywności fosfatazy alkalicznej, z których pierwsze posiadało większą ruchliwość elektroforetyczną w porównaniu do najszybciej migrującej formy molekularnej fosfatazy plazmy nasienia (ryc. 2a). Etap 4 godz. ekwilibracji powoduje dalszy wzrost donodowej ruchliwości elektroforetycznej szybko migrującego komponentu fosfatazy alkalicznej (ryc. 2b). Zymogram ten utrzymuje się po 24 godzinowym przechowywaniu nasienia w ciekłym azocie (ryc. 2c).



Ryc. 2. Zmiany obrazu enzymogramów na poszczególnych etapach mrożenia nasienia (a — po rozcieńczeniu; b — po 4 godz., ekwilibracji; c — po 24 godz. przechowywaniu w ciekłym azocie)

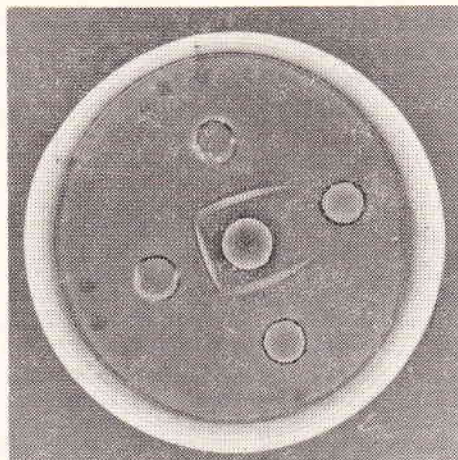
Wzrost ruchliwości elektroforetycznej I formy spowodowany może być utworzeniem kompleksu glikoproteinowego pomiędzy białkami plazmy nasienia i żółtka jaja kurzego, składnika rozcieńczalnika. Bowiem po barwieniu pro-

teinogramów odczynnikiem Schiffa frakcje glikoproteinowe umiejscowiane są zawsze w pozycjach ruchu pasm fosfotazowych na poszczególnych etapach zamrażania nasienia (ryc. 3). Obserwacje nasze wskazywałyby, że bezpośrednio po rozcieńczeniu nasienia białka fosfatazowe plemnika i plazmy, a zwłaszcza I forma molekularna, trwale wiążą się z białkami żółtka jaja kurzego. W wiązaniu tych dwóch białkowych komponentów rozcieńczalnika uczestniczy zapewne kwas sjalowy, którego zawartość na poszczególnych etapach technologii zamrażania nasienia buhaja nie ulega istotnym zmianom (9).

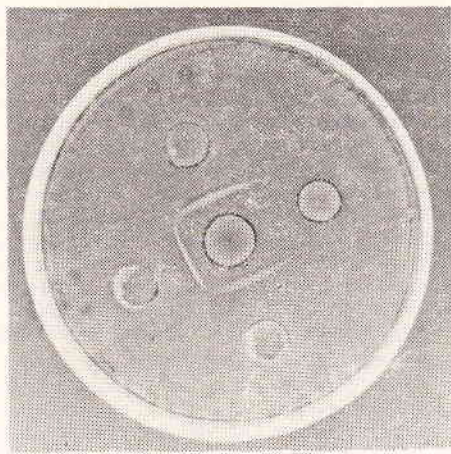


Ryc. 3. Proteinogram glikoprotein na poszczególnych etapach zamrażania nasienia (a — po rozcieńczeniu; b — po 4 godz. ekwilibracji; c — po 24 godz. przechowywaniu w ciekłym azocie)

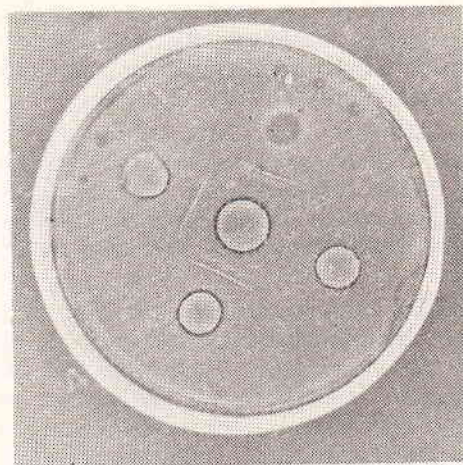
Wyraźnie sjaloproteinowa budowa I formy molekularnej fosfatazy alkalicznej plazmy nasienia buhaja (4) sprzyja bardziej trwałemu wiązaniu się tej formy z białkami żółtka jaja. Potwierdzają ten wniosek nasze obserwacje immunologiczne. Podwójna dyfuzja żelowa w układzie surowica odpornościowa wobec I formy molekularnej plazmy nasienia wykazała 2 lub 3 łuki precypitacyjne. Należy nadmienić, że nie uzyskano reakcji precypitacji między tą surowicą a stosowanym rozcieńczalnikiem.



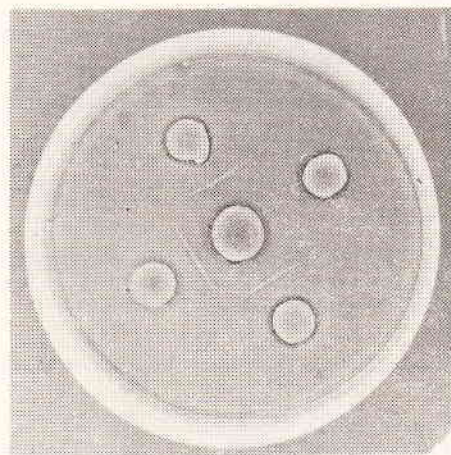
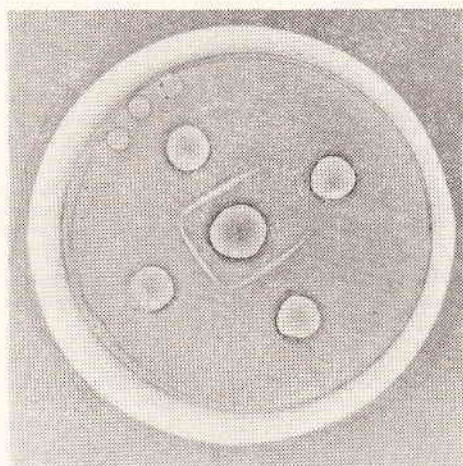
Ryc. 4a. Immunodyfuzja w układzie: antysurowica wobec I formy molekularnej — płyn nadosadowy po rozcieńczeniu nasienia



Ryc. 4b. i 4c. Immunodyfuzja w układzie antysuwrowica wobec I formy molekularnej — płyn nadosadowy po 4 godz. ekwilibracji (b) i po 24 godz. przechowywaniu w ciekłym azocie (c)



Ryc. 5a. Immunodyfuzja w układzie antysuwrowica wobec II formy molekularnej — płyn nadosadowy po rozcieńczeniu nasienia

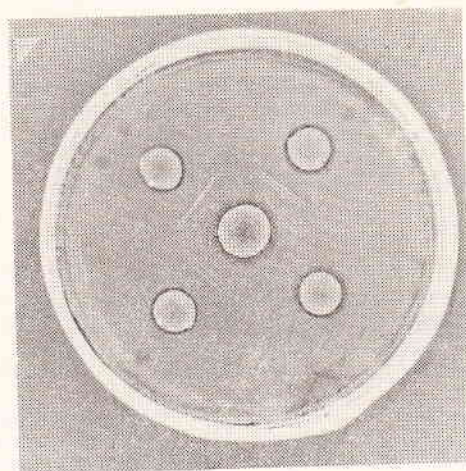


Przy zastosowaniu tej samej surowicy odpornościowej w układach dyfuzyjnych dotyczących poszczególnych etapów mrożenia nasienia stwierdzono na etapie rozcieńczenia nasienia obecność 2 ostrych łuków precypitacyjnych (ryc. 4a). Na etapach ekwilibracji i zamrażania układ ten nie ulega zmianom (ryc. 4a i 4c).

W podobnych reakcjach immunodyfuzji przy zastosowaniu surowicy odpornościowej wobec II formy molekularnej fosfatazy alkalicznej stwierdzono 2 lub 3 łuki precypitacyjne z białkami plazmy nasienia oraz brak precypitacji z rozcieńczalnikiem.

Etap rozcieńczenia nasienia zmienia ostrość łuków precypitacyjnych. Wyraźnie widoczne są trzy łuki, z których środkowy jest najbardziej ostry (ryc. 5a). Ekwilibracja rozcieńczonego nasienia powoduje zanik łuku precypitacyjnego położonego najbliższym zbiorniczka centralnego (ryc. 5b). Układ taki utrzymuje się po zamrożeniu i 24 godz. przechowywaniu nasienia w temperaturze ciekłego azotu (ryc. 5c).

Ryc. 5b. i 5c. Immunodyfuzja w układzie: antysuwrowica wobec II formy molekularnej — płyn nadosadowy po 4 godz. ekwilibracji (b) i po 24 godz. przechowywaniu w ciekłym azocie (c)



Wyniki badań immunologicznych wskazywałyby, że etapy biotechnologii zamrażania nasienia buhaja nie zmieniają istotnie antygenowych właściwości fosfatazy alkalicznej.

Reasumując — fosfataza alkaliczna plazmy nasienia wiążąc się z systemem koloidalnym białek żółtka jaja kurzego tworzy glikoproteinowy kompleks, który dobrze zapobiega jej zmianom denaturacyjnym podczas zamrażania nasienia.

Zjawisko to jednocześnie zabezpiecza podstawowe funkcje biochemiczne fosfatazy alkalicznej po rozmrożeniu i wprowadzeniu nasienia do żeńskich dróg płciowych. Związane są one głównie z udziałem fosfatazy alkalicznej w procesach metabolicznych podczas kapacytacji plemników i zapłodnienia komórki jajowej.

Piśmiennictwo

1. *Buruitana L. M.*: Proc. VIII-th Intern. Congr. Anim. Reprod. Artific. Inseminat., Krakow, vol. IV, 380, 1976.
2. *Bessey O. A., Lowry O. H., Brock M. J.*: J. biol. Chem., 164, 1946.
3. *Brown K. J., Crabo B. G., Graham E. F., Pace M. M.*: Cryobiology 8, 220, 1971.
4. *Glogowski J., Strzeżek J.*: Medycyna Wet. (w druku).
5. *Graham E. F., Pace M. M.*: Cryobiology 4, 75, 1967.
6. *Heber V.*: Cryobiology 5, 188, 1968.
7. *Maurer R. R.*: Disc-Elektrophorese, Berlin 1968.
8. *Strzeżek J.*: Zesz. probl. Post. Nauk. rol. z. 176, 21, 1976.
9. *Strzeżek J., Glogowski J.*: Zesz. probl. Post. Nauk. rol. z. 176, 93, 1976.
10. *Work T. S., Work E.*: Laboratory in biochemistry and molecular biology, vol. 1, Amsterdam, London, 1969.

Adres autora: dr Jan Glogowski, bl. Zoot. p. 233, 10-718 Olsztyn-Kortowo.

Глоговский Я., Стшежек Е. — Некоторые биохимические свойства щелочной фосфатазы во время замораживания семени быка.

Активность щелочной фосфатазы не подвергается существенным изменениям на отдельных технологических этапах замораживания семени быка. Наблюдали изменения зимограмм фосфатазы, особенно непосредственно после разбавления семени. Независимо от числа молекулярных форм в плазме семени появляются на этом этапе две электрофоретические фракции щелочной фосфатазы, подвижность которых не меняется существенным образом на этапах эквilibрации и заморозения семени. В пределах этих фракций локализовали гликопротеины. Не обнаружили отчетливых изменений антигенных свойств двух молекулярных форм щелочной фосфатазы после разбавления, эквilibрации, а также после заморозения и размораживания семени.

Следует отметить, что щелочная фосфатаза плазмы семени быка, связываясь с белками желтка куриного яйца, образует сильный гликопротеиновый комплекс, предотвращающий денатурационные изменения этого энзима во время замораживания семени в жидком азоте.

Glogowski J., Strzeżek J. — Some biochemical characteristics of alkaline phosphatase in the process of freezing of the bull semen.

The activity of alkaline phosphatase does not change its properties in different technological steps of bull semen freezing. The changes were observed only directly after semen dilution. Independently on the number of molecular forms in the semen plasma one can observe the appearance of two electrophoretic fractions of alkaline phosphatase. The presence of glycoproteins was noticed within the fractions. No distinct antigenic changes in the two molecular forms of alkaline phosphatase were found after dilution, equilibration, and freezing and thawing of the semen. Alkaline phosphatase of the bull semen plasma is conjugated with egg yolk proteins and the complex created unables denaturation of the enzyme during freezing of the semen in liquid nitrogen.

RIBELIN W. E., FUKUSHIMA K., STILL P. E.: Toksyczność ochratoksyny dla przeżuwaczy. (The toxicity of ochratoxin to ruminants). Can. J. comp. Med. 42, 172—176, 1978 (2).

Zdolność wytwarzania ochratoksyny posiada co najmniej 7 gatunków grzybów z rodzaju *Aspergillus* i 6 gatunków grzybów z rodzaju *Penicillium*. W USA głównym źródłem ochratoksyny jest *Penicillium viridicatum*. Ochratoksyna wytwarzana przez ten grzyb występuje w przerosniętych grzybnia ziarnach, pokarmach i w glebie. U bydła rzadko występują ostre zatrucia ochratoksyną, częściej spotyka się zatrucia chroniczne. Letalna doustna dawka ochratoksyny dla krów wynosi ponad 15 mg/kg wagi ciała, zaś dla kóz przy kilkakrotnym stosowaniu 3 mg/kg wagi ciała. Ochratoksyna jedynie w przypadku silnych zatruc występuje w mleku i moczu. Dotychczas nie obserwowano zamierania płodów i ronień u przeżuwaczy po zatruciach ochratoksyną.

G.

MARSOLAIS G., ASSAF R., MONPETIT C., MAROIS P.: Rozpoznawanie czynników wirusowych związanych z biegunką nowo narodzonych cieląt. (Diagnosis of viral agents associated with neonatal calf diarrhea). Can. J. comp. Med. 42, 168—171, 1978 (2).

Przebadano w kierunku występowania wirusów 134 próbki kału pobrane od cieląt w okresie pierwszych 5—6 godzin po wystąpieniu biegunki oraz zeszkobinę

jelita czczego cieląt poddanych ubojowi 3 dnia po wystąpieniu biegunki. W oparciu o badania w mikroskopie elektronowym i odczyn immunofluorescencji stwierdzono w badanych próbkach wirusy Nebraska (rotawirus i coronawirus). W 54% badanych próbek występowały obydwu wirusy, w 53% próbek coronawirus i w 14% próbek rotawirus. Ponadto w 104 próbkach w których stwierdzono obecność wirusów Nebraska stwierdzono 4 wirusy biegunki bydła, dwa wirusy zakaźnego zapalenia nosa i tchawicy oraz dwa enterowirusy. Odczyn immunofluorescencji dawał najlepsze efekty w wykrywaniu obecności wirusów Nebraska.

G.

PEAKER M.: Czas trwania ciąży i wielkość miotu u kóz. (Gestation period and litter size in the goat). Br. vet. J. 134, 379—383, 1978 (4).

Celem badań było określenie czasu trwania ciąży, wielkości miotu, odsetku płodów urodzonych przedwcześnie oraz proporcji między płciami w miotach kóz. Na podstawie obserwacji 374 kóz stwierdzono, że średni czas trwania ciąży wynosi 150 dni, 90% wykotów notowano między 146 i 154 dniem ciąży. Liczba koźląt u pierwiastek była zawsze niższa aniżeli po drugiej i dalszych ciążach. Porody przedwcześnie stwierdzono w 4,7% przypadków. Spośród 842 koźląt 426 stanowiły samice, 403 samce i 13 interseksy.

G.