

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JERZY STRZEZEK, TADEUSZ BUCKO, ZDZISŁAW JASTAK

Wstępne obserwacje miana spermaglutynin w surowicach krwi krów i jałówek rasy ncb

Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt AR-T w Olsztynie

Dyrektor: prof. dr W. MINAKOWSKI

Powszechne stosowanie inseminacji związane jest z wprowadzeniem do żeńskiego układu płciowego nie tylko białkowych komponentów nasienia lecz również białek mleka i obcogatunkowych białek żółtka jaja, jako składników rozcieńczalnika nasienia. Zarówno białka nasienia jak i białka składników rozcieńczalnika posiadają właściwości immunogenne (7, 8, 20). Stąd dla prawidłowego użytkowania reprodukcyjnego samic ma szczególne znaczenie stan żeńskiego układu płciowego w czasie zabiegu inseminacyjnego. Obniżona płodność samic koreluje bowiem z wysokim mianem specyficznych spermoprzeciwciał w surowicy krwi (5, 6, 9, 14, 16, 18). Szczególnie wysokie miano izospermoprzeciwciał, głównie typu spermaglutynin, obserwowano w surowicy krwi krów kilkakrotnie unasienianych przy niepełnej involucji macicy lub stanach chorobowych narządów rodnych (5, 6). Należy podkreślić, że bardzo niskie miano spermaglutynin występują normalnie w surowicy krwi krów nie wykazujących zaburzeń w płodności oraz u jałówek (19).

Miejsce syntezy oraz budowa chemiczna spermaglutynin nie są dokładnie wyjaśnione. Przypuszcza się, że pochwa i macica są miejscem ich nowstawiania. Według niektórych autorów (3, 4) w surowicach aktywnych w testach makroaglutynacyjnych spermaglutyniny posiadają typową budowę immunoglobulin — Ig 6, zaś w surowicach aktywnych w testach mikroaglutynacyjnych — budowę beta-globulin.

Celem niniejszej pracy było przesledzenie miana spermaglutynin w surowicy krwi krów użytkowanych w warunkach jednego z państwowych gospodarstw rolnych, w powiązaniu z ich płodnością.

Material i metody

Surowicę krwi otrzymano od 40 krów użytkowanych w PGR K. Na podstawie dokumentacji zootechniczno-weterynaryjnej wyodrębniono dwie grupy krów w wieku od 3—7 lat. Grupę I stanowiły krowy (19 sztuk) zacielone po pierwszym zabiegu inseminacyjnym, grupę II — krowy (21 sztuk) kilkakrotnie unasieniane nasieniem tego samego buhaja i niecielne. Grupa III (kontrolna) obejmowała surowicę jałówek w wieku 10—14 miesięcy (10 sztuk).

Surowice poddano oznaczeniu miana spermaglutynin za pomocą testu żelatynowego według Kibricka

i wsp. (13). Do próbek mikrobiologicznych (0,7 × 7 cm), zawierających badaną surowicę rozcieńczoną w płynie fizjologicznym w stosunkach od 1:1 do 1:2048, dodano po 0,3 ml nasienia rozproszanego w 10% żelatynie. Żelatynowa mieszanina nasienia posiadała koncentrację plemników 40 mln./ml przy temperaturze 310°K. Po dokładnym wymieszaniu, próby inkubowano w temperaturze 310°K przez 3 godziny. Odczytów miana aglutynacji dokonywano wobec próby kontrolnej (bez surowicy krwi) stosując skalę intensywności aglutynacji od 4+ do 1+. Dla każdej próby surowicy wykonywano po dwa oznaczenia miana spermaglutynin.

Wszystkie próby wykonywano w warunkach laboratoryjnych zakładu unasieniania zwierząt. Jako antygen używano nasienia o dobrej ruchliwości i koncentracji plemników, pobieranego na sztuczną pochwę od 3 buhajów użytkowanych w PZUZ Lidzbark Warmiński. Nasienie tych buhajów stosowane było do unasieniania krów objętych obserwacją.

Z tab. 1 wynika, że miano spermaglutynin u jałówek i krów grupy I były kilkakrotnie niższe w porównaniu do mian uzyskanych od krów gr. II — wykazujących zaburzenia w płodności. Na uwagę zasługują wartości najniższych i najwyższych mian spermaglutynin.

Tab. 1. Średnie wartości miana spermaglutynin w surowicach krwi krów i jałówek objętych obserwacją

Grupa	Liczba osobników <i>n</i>	Miano spermaglutynin ^{*)} <i>X</i>	Rozstęp
I	19	1:45	1:4 - 1:128
II	21	1:914	1:128 - 1:2048
III	10	1:12	1:8 - 1:16

* średnia arytmetyczna z dwóch analiz.

Wyniki

W tab. 2 i 3 podano wyniki analiz spermaglutynin w surowicach krwi poszczególnych krów grupy I i II. Tabele te dodatkowo zawierają dane odnośnie wieku krów i długości przestoju poporodowego, zaś w przypadku krów nieplodnych — liczbę zabiegów inseminacyjnych.

Należy zwrócić uwagę na występującą u krów grupy II zależność poziomu miana spermaglutynin w surowicy od liczby zabiegów inseminacyjnych oraz stanu układu płciowego (tab. 3). Szczególnie w przypadku stanów zapalnych układu płciowego miano spermaglutynin było podwyższone. W większości obserwacji osiągało maksymalne wartości rozcieńczenia surowicy — 1:2048.

Stosunkowo niewielka liczba obserwacji nie pozwala na analizę wpływu długości okresu przestoju poporodowego na wysokość miana. Tym niemniej można zaobserwować, że niektóre krowy grupy II, wykazujące zaburzenia w układzie płciowym lub wysokie miano spermaglutynin w surowicy, unasieniane były albo po

Tab. 2. Miano spermaglutynin w surowicach krwi krów grupy I.

Nr oborowy	Wiek lat	Długość przestoju poporodowego (dni)	Miano
551	3	23	1:16
561	3	90	1:64
562	3	36	1:32
518	4	49	1:4
380	5	62	1:8
403	5	61	1:32
436	5	86	1:64
01	6	47	1:8
04	6	38	1:32
102	6	51	1:128
303	6	87	1:64
327	6	69	1:8
358	6	49	1:64
440	6	89	1:8
464	6	47	1:8
05	7	73	1:64
280	7	69	1:64
302	7	108	1:128
313	7	83	1:64
\bar{x}	5,4	64,5	1:45

zbyt krótkim okresie przestoju poporodowego albo wydłużonym — powyżej 80 dni (tab. 3). Natomiast u krów grupy I (tab. 2) powiązań takich nie zaobserwowano mimo że krowy starsze (6—7 lat) posiadały nieznacznie wyższe miano spermaglutynin oraz dłuższy okres przestoju poporodowego.

W tab. 4 przedstawiono wyniki obserwacji wpływu nasienia buhaja na wysokość miana spermaglutynin u niektórych krów z zaburzeniami płodności (gr. II).

Surowice krów unasienianych kilkakrotnie nasieniem buhaja Hadym, wykazywały w stosunku do tego nasienia wysokie miano spermaglutynin. Krowy traktowane nasieniem innego buhaja wykazywały zdecydowanie niższe wartości miana. Należy podkreślić, że obserwacja ta dotyczyła tylko wybranych krów z grupy II bowiem w przypadku krów ze zdrowym układem rozrodczym, unasienianych nasieniem buhaja Hadym, nie zaobserwowano zaburzeń w płodności.

Tab. 3. Miano spermaglutynin w surowicach krwi krów wykazujących zaburzenia w płodności (grupa II)

Nr oborowy	Wiek (lat)	Liczba inseminacji	Długość przestoju poporodowego (dni)	Miano ²⁾	Uwagi ¹⁾
524	7	4	141	1:2048	endometritis, roniencja
07	6	3	173	1:256	
281	7	3	40	1:2048	
419	6	3	148	1:2048	
421	6	3	64	1:2048	endometritis
06	5	3	30	1:128	afunkcja jajników
580	4	3	72	1:1024	endometritis
339	5	2	48	1:512	afunkcja jajników
357	5	2	89	1:128	
372	6	2	49	1:512	
373	6	2	69	1:512	endometritis
414	6	2	32	1:1024	
444	5	2	79	1:2048	afunkcja jajników
447	5	2	85	1:1024	
470	6	2	43	1:256	
505	4	2	77	1:512	afunkcja jajników
522	5	2	141	1:512	afunkcja jajników
520	4	2	147	1:128	afunkcja jajników
525	4	2	28	1:2048	
550	3	2	33	1:128	
570	4	2	68	1:256	
\bar{x}	5,1		78,8	1:914	

1) na podstawie zapisków weterynaryjno-zootechnicznych.

2) wyniki analizy miana spermaglutynin zestawiono według liczby zabiegów inseminacyjnych nasieniem tego samego buhaja

Dyskusja

Badania nasze potwierdzałyby obecność specyficznych spermaglutynin zarówno w surowicach krwi krów jak i jałówek. Etiologia ich powstawania poznana została stosunkowo niedawno. Obserwacja Isojima (10), Katsh (11) i Mc Laren (15) wykazały, że płodność samic może być wyraźnie obniżona poprzez immunizację homologicznymi plemnikami. Wynik immunizacji uzależniony jest od gatunku zwierząt, metody przygotowania antygeny oraz techniki immunizowania.

Natomiast Behrman (2) stwierdził, że immunizowanie świńek morskich homogenatami jąder lub plemnikami z najdłuższy powoduje nagromadzenie się przeciwciał aglutynujących plemniki przede wszystkim we krwi, w mniejszym zaś stopniu w wydzielinach macicy i pochwy. Może to wskazywać na powstawanie w układzie płciowym samicy dwóch typów przeciwciał: przeciwciał krążących we krwi oraz typu tkankowego. Behrman zaobserwował również, że nabłonek pochwy, gruczoły szyjki macicy oraz dystalna część macicy i węzły limfatyczne są miejscami nagromadzenia się spermoprzeciwciał.

Austin (1) oraz Sokołowska i Resznetnikowa (18) zwrócili uwagę na rolę makrofagów macicy i fagocytozy w powstawaniu uczulenia samicy na plemniki. Wprowadzenie dużej liczby plemników do macicy nie podwyższało miana przeciwciał we krwi, ale ich fagocytoza w drogach płciowych powodowała zwiększenie zamierania zarodków.

Tab. 4. Wpływ nasienia buhaja na wysokość miana spermaglutynin.

Nr oborowy	Nazwa buhaja					
	Hadym		Harlem		Histeryk	
	Liczba inseminacji	Miano spermaglutynin	Liczba inseminacji	Miano spermaglutynin	Liczba inseminacji	Miano spermaglutynin
281	3	1:2048	1	1:16	—	1:8
419	3	1:2048	—	1:64	7	1:8
505	2	1:512	1	1:32	—	1:8
524	4	1:2048	1	1:16	—	1:32
525	—	1:2048	2	1:2048	1	1:8

Ostatnio Resznetnikowa i Sokołowska (17) zaobserwowały obniżenie płodności oraz wzrost zamierania zarodków u krów unasienianych w okresie nie zakończonej involucji macicy. Towarzyszyły temu stany zapalne układu płciowego, które pojawiały się już w 24 godziny po wprowadzeniu plemników do macicy lub głęboko do szyjki macicy. Uodpornianie nie przeszkadzało pojawieniu się następnej rui; 18—24 dnia krowy ponownie unasieniano, powodując tym samym wzrost poziomu spermoprzeciwciał. Podobne wyniki otrzymał Marczuk (14). Autor ten wykazał u krów unasienianych z objawami stanów zapalnych układu płciowego wysokie miano spermoprzeciwciał w granicach od 1:320 — 1:1280. Również krowy unasieniane kilkakrotnie, bez objawów procesów zapalnych w drogach rodnych, posiadały miano zwiększające się z liczbą zabiegów inseminacyjnych do poziomu 1:640 — 1:1280. Samice szczurów, które im-

munizowano nasieniem tego samego gatunku, wykazywały zaburzenia procesu embriogenezy i podwyższone miano spermoprzeciwciał w surowicy (1:640 — 1:1280).

Griffin i wsp. (9) stwierdzili natomiast wysokie miana przeciwciał w wydzielinach pochwy i macicy krów kilkakrotnie unasienianych. Szczególnie wysokie miana przeciwciał występowały w stosunku do składnika nasienia — żółtka jaja.

Jest interesującym, że krowy posiadające niskie miana przeciwciał w stosunku do białek żółtka jaja w surowicy krwi, wykazywały wysokie miana w śluzie pochwowym i wydzielinie szyjki macicy. U krów tych stwierdzono istotne obniżenia płodności.

Znacznie wcześniej Bratanow i wsp. (5, 6, 7) sygnalizowali pojawienie się wysokich wartości miana spermaglutynin (1:512 — 1:1024) u krów unasienianych zbyt wcześnie po porodzie, z objawami zapalenia błony śluzowej macicy lub krwawienia macicznego.

Z naszych badań wynika, że krowy grupy II, u których przyczyną niepłodności mogły być według diagnozy lekarza weterynarii, między innymi, stany zapalne błony śluzowej macicy, posiadały wysokie miana spermaglutynin zapewne na skutek ich immunizacji. Można przypuszczać, że wysokie miana spermaglutynin w surowicy krwi tych krów (1:2048) mogły powodować nagromadzenie się spermoprzeciwciał w macicy i pochwie, powodując zaburzenia płodności samic.

Reszetnikowa i Sokołowska (17) stwierdziły wysoką antygenowość płynu embrionalnego oraz zgodność antygenową tych płynów z niektórymi antygenami plemnika. I tak: antysurowica wobec ekstraktu zarodka w reakcji immunodiffuzji według Ouchterlony dawała 6 linii precipitacyjnych z ekstraktami zarodków, 4 z ekstraktami plemników, 5 z płynem owodniowym oraz 2 linie precipitacyjne z białkami plazmy nasienia i ekstraktami łożyska. Natomiast antysurowica wobec płynu owodniowego dawała 6 linii precipitacyjnych z ekstraktami 90 dniowych zarodków oraz płynem owodniowym. Antysurowica wobec plemników dawała 6 linii precipitacyjnych wobec plemników (4 specyficzne tylko dla plemnika) oraz 2 linie z plazmą nasienia i ekstraktami 30 dniowych zarodków zaś 1 linia precipitacyjna występowała wobec płynu owodniowego.

Można przypuszczać, że pojawienie się przeciwciał wobec plemników białek plazmy nasienia w surowicy krwi samicy może spowodować również zaburzenia w rozwoju zarodka, a tym samym jego zamieranie i tzw. bezobjawową niepłodność samic. W tych przypadkach duże znaczenie będzie miała osobnicza odpowiedź immunologiczna krów na antygeny nasienia niektórych buhajów. Zjawisko takie zaobserwowano w naszej pracy odnośnie nasienia buhaja Hadym. Ostatnio również Pawliczenko i wsp. (16) wykazali, że przeciwciała

aglutynujące plemniki jednych buhajów przy wysokim rozcieńczeniu surowicy, dla innych buhajów przy wysokim rozcieńczeniu surowicy, dla innych buhajów były aglutynujące w niskich rozcieńczeniach surowicy. Autorzy pracy wnioskują, że dla likwidacji niepłodności niektórych krów stosować należy odpowiedni dobór nasienia rozplodników, w stosunku do którego istnieje w surowicy krwi niska zdolność aglutynująca plemniki. Jako górną, dopuszczalną granicę miana spermaglutynin w surowicy krwi krowy Pawliczenko i wsp. (16) podają wartości 1:64 — 1:128.

Według Bratanowa i wsp. (5) stwierdzenie wysokiego miana spermoprzeciwciał w surowicy krowy jałowiącej wymaga przede wszystkim zmiany nasienia buhaja oraz opuszczenia 1—2 cykli płciowych.

Należy jednak zwrócić uwagę, że pojawienie się reakcji immunologicznej na homologiczne plemniki i białka plazmy nasienia oraz żółtka jaja uzależnione jest nie tylko od stanu żeńskiego układu płciowego (zwłaszcza macicy) ale również od żywienia krowy w okresie ciąży i po porodzie. Krowy nie wykazujące zaburzeń w płodności posiadają bowiem aktywne systemy enzymatyczne, które mogą inaktywować antygeny nasienia i składników rozcieńczalnika oraz specyficzne spermoprzeciwciała (12).

Nasze badania podkreśliły możliwość zastosowania analizy miana spermaglutynin w surowicy krwi krów, zwłaszcza w przypadkach trudnych dla postawienia prawidłowej diagnozy określającej przyczynę niepłodności. Analiza taka może być wykonywana w warunkach laboratoryjnych zakładów unasieniania zwierząt przy pomocy odpowiednio przeszkolonego personelu weterynaryjnego lub zootechnicznego.

Rozpoczęte badania wymagają dalszej kontynuacji.

Piśmiennictwo

1. Austin G. R.: J. Endocr. 14, 335, 1957.
 2. Behrman S. J., Otani Y.: Int. J. Fertil. 8, 829, 1963.
 3. Boetcher B., Kay J. D.: J. Reprod. Fertil. 27, 107, 1971.
 4. Boetcher B.: Second International Symposium on Immunology of Reproduction, Warna, 1971.
 5. Bratanow K., Dikow W., Radew G., Danow D.: Wet. med. nauki, 4, 323, 1965.
 6. Bratanow K., Dikow W., Popowa J.: Izwiestija na NJJBR 3, 1962.
 7. Bratanow K., Dikow W., Popowa J.: Wet. med. nauki 7, 683, 1966.
 8. Dikow W., Iwanowa M., Christowa-Kolewa M.: Wet. med. nauki 8, 71, 1969.
 9. Griffin J. F. T., Nunn W. R., Hartigan P. J.: J. Reprod. Fertil. 25, 193, 1971.
 10. Isojima S., Ashitaka Y.: Am. J. Obstet. Gynec. 88, 433, 1964.
 11. Katsh S.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 73, 698, 1958.
 12. Katsh S., Aguirre A., Katsh G.: Fert. Steril. 5, 740, 1968.
 13. Kibrick S., Belding D. L., Merrill B.: Fert. Steril. 3, 430, 1952.
 14. Marczuk A. T.: Second Internat. Symp. on Immunology of Reproduction, Warna, 1971.
 15. Mc Laren A.: Nature 201, 532, 1964.
 16. Pawliczenko W. P., Dorożilow A. E., Sirażdinow R. S.: Second Internat. Symp. on Immunology of Reproduction, Warna, 1971.
 17. Reszetnikowa H. M., Sokołowska J. J.: Ziwnotnowodstwo 1, 44, 1972.
 18. Sokołowska J. J., Reszetnikowa H. M.: Ziwnotnowodstwo 6, 63, 1968.
 19. Torniow A.: Wet. med. nauki 6, 83, 1967.
 20. Torniow A.: Immunology of Spermatozoa and Fertilization Proc. Int. Symp., Warna, 1967.
- Adres autora: dr Jerzy Strzeżek, Olsztyn-Kortowo, Wydział Zootechniczny.

Стшежек Е., Буцко Т., Ястак З. — **Предварительные исследования титра спермаагглютининов в сыворотках крови коров и телок черной и белой низменной породы.**

Исследования провели при помощи метода макроагглютинации по Kilbrick. Установили, что все сыворотки крови исследованных животных содержали специфические спермаагглютинины. Титр их в сыворотках крови телок группы III и коров стельных после первой инсеминации т.е. группы I был несколько раз ниже титра коров гр. II заключающей коровы с расстройством расплода. Средний титр этих групп равнялся соответственно 1:12, 1:45 и 1:914.

Отметили влияние семени некоторых быков на уровень титра спермаагглютининов в сыворотках крови коров несколько раз инсеминированных и остающихся стерильными.

Strzeżek J., Bućko T., Jastak Z. — **Preliminary observations on the titer of spermagglutinins in sera of cows and heifers of black and white breed.**

The preliminary observations on the level of spermatoagglutinins were carried out by the use of Kilbrick's macroagglutination test. The specific spermatoagglutinins were noted in all the sera under study. The level of spermatoagglutinins in the sera of heifers (group III) and in the cows pregnant following the first artificial insemination (group I) was several times lower in comparison to the level of spermatoagglutinins in cows (group II) with the signs of disturbances in fertility (the mean values were 1:12, 1:45 and 1:914, respectively). There was also observed the influence of the semen of certain bulls on the level of spermatoagglutinins in cows several times artificially inseminated and being sterile.

ZDZISŁAW BORYCZKO, ZYGMUNT KARWAT, LUDOMIR PIETRZAK

Próby ustalenia zależności między niektórymi wskaźnikami jakości nasienia mrożonego a jego zdolnością zapładniającą

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Katowicach

Kierownik: dr habil. A. FUROWICZ

Ocena wartości nasienia konserwowanego w niskich temperaturach w głównej mierze opiera się na takich wskaźnikach jak: ocena szacunkowa odsetka plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu oraz długość czasu przeżywania w temp. 46,5°C (1, 3, 4, 5, 10). Średnie dla tych parametrów mogą się różnić, co uzależnione jest wg szeregu autorów (6, 7, 9, 11, 12) od wartości wyjściowych parametrów jakościowych nasienia, sposobu przygotowania nasienia do zamrożenia i metodyki samego mrożenia. Również i wyniki zapłodnień krów unasienianych nasieniem mrożonym wykazują pewne wahania (2, 3, 10, 11), w zasadzie jednak nie odbiegają wiele od uzyski-

wanych dla nasienia przechowywanego w temp. + 4°C.

Wielkość parametrów kwalifikujących nasienie mrożone jako przydatne do unasieniania określa obowiązująca w tym zakresie Instrukcja Ministerstwa Rolnictwa — Departamentu Produkcji Zwierzęcej, w której przyjmuje się dla nasienia mrożonego przeznaczonego do obrotu krajowego wartość minimum 30% plemników o ruchu postępowym oraz 37 minutowy czas przeżywania w temp. 46,5°C (dla nasienia w obrocie międzynarodowym podwyższony jest odsetek plemników o ruchu postępowym do 40).

Tab. 1. Procent plemników o ruchu postępowym, długość czasu przeżywania w temp. 46,5°C nasienia w poszczególnych grupach badawczych w odniesieniu do skuteczności unasienienia po pierwszym zabiegu unasienienia

Grupa badawcza	Liczba buhajów w poszczególniej grupie badawczej	Liczba badanych partii nasienia mrożonego	Procent plemników o ruchu postępowym (średnia)	Długość czasu przeżywania w minutach średnia (zakres wahań)	Skuteczność unasienienia po pierwszym zabiegu unasienienia (średnia)
I	6	8	40,0	15,0 (7,5 — 20,0)	48,7
II	6	10	32,0	25,5 (20,0 — 27,5)	60,6
III	7	12	35,8	31,6 (27,5 — 35,0)	53,9
IV	6	20	36,0	39,7 (35,0 — 42,5)	67,0
V	7	11	40,0	54,3 (42,5 — 75,0)	69,4