

JERZY STRZEŻEK, TADEUSZ ROTKIEWICZ, JÓZEF LIMINOWICZ

Wskaźniki biochemiczne w zastosowaniu do oceny jakości nasienia zwierząt gospodarskich. VI. Obserwacje zmian w białkach plazmy nasienia buhajów ze stanami zapalnymi narządu rozrodczego*)

Z Instytutu Fizjologii i Biochemii Zwierząt AR-T w Olsztynie

Przewlekły charakter procesów zapalnych narządu rozrodczego znacznie opóźnia wykrycie początkowego stadium chorobowego. Zmiany chorobowe objawiają się praktycznie już w postaci pogorszenia wskaźników jakości nasienia i obniżonej płodności rozplodnika.

Infekcyjne lub nieinfekcyjne, często immunologiczne, podłoże procesu zapalnego powoduje zmiany w białkach tkanki śródmiąższowej narządu lub wydzielinach gruczołów płciowych (3, 4, 11, 13, 14, 20). Procesom tym towarzyszą zaburzenia dotyczące zwłaszcza aktywności białek enzymatycznych nasienia i ich form molekularnych — izoenzymów (8, 9, 17); zmiany w stosunkach ilościowych frakcji białkowych plazmy nasienia (18) oraz zaburzenia w wydzielaniu innych składników biochemicznych (4, 7, 12).

Według Ungara (21) wszystkie odchylenia od normy w stanach zapalnych spowodowane są uaktywnieniem bądź syntezą enzymów proteolitycznych. W silnie rozwijającej się tkance łącznej zmienionego chorobowo narządu rozrodczego tryka stwierdzono wzrost poziomu RNA (19).

Obserwacja białek plazmy nasienia, ze względu na ich syntezę w szeregu dodatkowych gruczołach płciowych i jądrach oraz udział w metabolizmie nasienia, może być pomocna w szybkim rozpoznaniu stanu czynnościowego narządu rozrodczego buhaja.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na plazmie nasienia i ekstraktach jąder i najądrzy dwóch buhajów rasy ncb, w wieku 4—5 lat, wybrakowanych z użytkowania rozplodowego na skutek zmian jakości nasienia i niepłodności. Jako materiał kontrolny służyło nasienie z normospermią uzyskane od buhajów stanowiących własność PZUZ w Olsztynie oraz wycinki jąder i najądrzy od 25 sztuk buhajków w wieku do 2 lat opasanych w gospodarstwie RZD Pozorty. Ekstrakty jąder i najądrzy wykonywano w buforze fosforanowym pH=7,5 wg Sørensen. Białko całkowite oznaczano metodą biuretową wg Weichselbauma. Rozdziałów frakcji białkowych (plazmy nasienia i ekstraktów jąder i najądrzy) dokonano metodą elektroforezy na

żelu poliakrylamidowym wg Daviesa (5). Do oznaczeń jakościowych frakcji białkowych zastosowano, po uzgodnieniu przystosowaniu, aparat samorejestrujący ERJ-10 prod. Zeiss-Jena.

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oznaczano za pomocą UV — testów Fermognost prod. NRD zaś izoenzymy LDH wybarwiano po rozdzieleniu na żelu poliakrylamidowym wg metody Wilkinsona i Withycombe (22).

Bezpośrednio po uboju buhajów przeprowadzono badania makroskopowe narządów rozrodczych a następnie pobrano wycinki jąder i najądrzy do badań histopatologicznych. Zastosowano techniki podane w opracowaniu Bagińskiego (2). Wycinki utrwalono w zobojętnionej formalinie 1:10. Stosowano skrawki parafinowe, które barwiono hematoksyliną i eozyną za reakcją PAS wykonano wg Me Manusa. Preparaty srebrzono wg metody Gomoriego. Kwasy nukleinowe wybarwiono wg metody Feulgena i Unny. Zawartość kwasów nukleinowych oznaczano mikrofotometrycznie przy zastosowaniu światła monochromatycznego o długości fali 5500 Å (16).

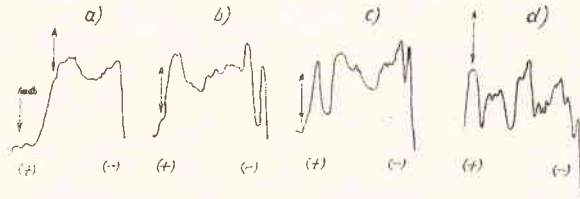
Wyniki

W badaniach makroskopowych u buhaja A stwierdzono znacznie powiększone i twarde jądra. Na przekroju osłonki jądrowe były ściśle zespolone ze sobą, łącznie z osłonką białawą tworzyły grubą łącznotkankową torebkę jądra. W miąższu jądra występowały liczne, wielkości ziarna prosa ogniska martwicowe, otoczone wyraźną warstwą tkanki łącznej. Głowa i ogon najądrzy w zaniku, ściśle przylegały do powierzchni jądra. Na przekroju widoczne były duże, zatokowato rozszerzone przewody wyprowadzające otoczone grubą warstwą tkanki łącznej. Natomiast u buhaja B stwierdzono jądra nieznacznie powiększone, twarde. Powierzchnia przekroju przypominała swym wyglądem powierzchnię przekroju jądra buhaja kontrolnego.

Mikroskopowo w preparatach histopatologicznych wykonanych z wycinków jąder buhaja A, obok silnych nacieków komórkowych, stwierdzono liczne ogniska martwicy skrzepowej z wyraźną reakcją dodatnią PAS i Feulgena. Wokół tych ognisk występowała młoda tkanka łączna, zbudowana z licznych fibroblastów, histiocytów i srebrochlonych włókien oraz nielicznych naczyń krwionośnych. W preparatach buhaja B stwierdzono nacieki komórkowe w jądrach i najądrzach oraz liczne ogniska zmian wstecznych komórek nabłonka kanalików nasieniotwórczych. Kanalik nasieniotwórcze, o różnej średnicy, zawierały często w swym świetle rozpadłe komórki nabłonkowe, upłynione plemniki jak również komórki z pyknotycznym jądrem i licznymi wodniczkami. Równocześnie stwierdzono zgrubiałą błonę podstawową kanalików nasieniotwórczych oraz rozrost tkanki łącznej międzykanalikowej.

*) Praca została wykonana w ramach problemu resortowego 132 E, „Biologia rozrodu zwierząt i organizacja sztucznego nasieniania” koordynowanego przez Instytut Zootechniki.

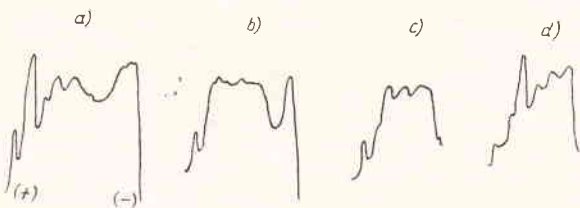
Obserwacje histochemiczne preparatów jądra i najądrzy wykazały niewielki wzrost zawartości DNA w niektórych młodych komórkach tkanki łącznej jąder buhaja A. Szczególnie duże nagromadzenie RNA obserwowano w cytoplazmie wszystkich komórek w jądrach buhaja A. Natomiast w cytoplazmie komórek jąder buhaja B wzrost zawartości RNA był nieco mniejszy. Stany zapalne narządów rozrodczych spowodowały nie tylko zmiany wskaźników jakości nasienia (buhaj A — aspermia, buhaj B — oligospermia i necrospermia), ale również zmiany biochemiczne w wydzielinach i tkankach.



Ryc. 1. Wykresy densitometryczne elektroforegramów białek plazmy nasienia i surowicy krwi

Objaśnienia: a) frakcje białkowe plazmy nasienia buhaja A, b) frakcje białkowe plazmy nasienia buhaja B, c) frakcje białkowe plazmy nasienia buhaja z norm ospermią, d) frakcje białkowe surowicy krwi buhaja

Ryc. 1 przedstawia wykresy densitometryczne rozdzielców elektroforetycznych na żelu poliakrylamidowym białek plazmy nasienia buhajów ze stanami zapalnymi narządu rozrodczego. Dla porównania załączono elektroforegramy białek plazmy nasienia z normospermią oraz białek surowicy krwi. W plazmie nasienia buhajów A i B — widoczne są zmiany we frakcjach globulinowych oraz nieznaczny wzrost zawartości frakcji albuminowej.



Ryc. 2. Wykresy densitometryczne elektroforegramów frakcji białkowych ekstraktów jądra, głowy najądrza, ogona najądrza buhajów A i B

Objaśnienia: a) frakcje białkowe ekstraktu jądra buhaja A, b) frakcje białkowe ekstraktu jądra buhaja B, c) frakcje białkowe ekstraktu głowy najądrza buhaja B, d) frakcje białkowe ekstraktu ogona najądrza buhaja B

Podobne zaburzenia obrazu frakcji białkowych stwierdzono w ekstraktach jąder i najądrzy tych buhajów (ryc. 2) w porównaniu do ekstraktów uzyskanych od zdrowych buhajów (ryc. 3).

Odchyleniom w elektroforegramach frakcji białkowych towarzyszyły wyraźne zmiany aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), które przedstawiono w tab. 1 i 2.

Enzymogramy LDH przedstawiono na ryc. 4. W plazmie nasienia buhaja A stwierdzono dominację izoenzymu LDH — 1, podobnie jak w białkach surowicy krwi, oraz całkowity zanik izoenzymów o najmniejszej ruchliwości, charakterystycznych dla ejakulatów z normospermią. W ekstraktach jąder buhaja A zaob-



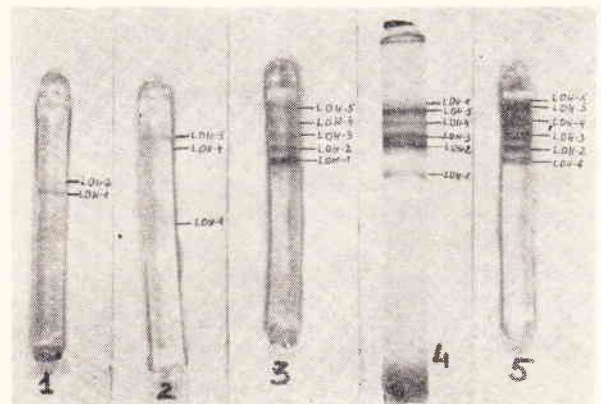
Ryc. 3. Wykresy densitometryczne elektroforegramów frakcji białkowych ekstraktów jądra, głowy najądrza, ogona najądrza buhaja z normospermią

Objaśnienia: a) frakcje białkowe ekstraktu jądra, b) frakcje białkowe ekstraktu głowy najądrza, c) frakcje białkowe ekstraktu ogona najądrza

serwowano osłabienie aktywności izoenzymu LDH-X, charakterystycznego dla jąder i najądrzy buhajów zdrowych, jak również zmiany aktywności pozostałych izoenzymów. Natomiast zmiany aktywności LDH w poszczególnych odcinkach narządu rozrodczego buhaja B nie korelowały ze zmianami enzymogramu.

Omówienie wyników

Przyczyny stanów zapalnych męskiego narządu rozrodczego są jeszcze mało poznane. Zazwyczaj procesy chorobowe jąder i najądrzy powodują zmiany w całym narządzie rozrodczym jak również w jego funkcji wydzielniczej. Wiąże się to przede wszystkim ze zmianami jakości syntetyzowanych białek.



Ryc. 4. Izoenzymogramy białek o aktywnościach dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

Objaśnienia: 1. plazma nasienia buhaja A, 2. plazma nasienia buhaja z normospermią, 3. surowica krwi, 4. ekstrakt jąder buhaja z normospermią, 5. ekstrakt jąder buhaja A

Ostatnio Balbierz i wsp. (3) stwierdzili w przypadkach stanu chorobowego narządu płciowego buhajów zmiany jakościowe we frakcjach białkowych plazmy nasienia, wędrujących najszybciej do anody w rozdzielach na żelu skrobiowym; natomiast zmiany kliniczne narządu rozrodczego zbiegały się z odchyleniami w stężeniu frakcji dokatodowych. Również Boryczko i wsp. (4) potwierdzili zaburzenia dotyczące

białek surowicy krwi i plazmy nasienia buhajów z eksperymentalnie wywołanymi stanami zapalnymi jąder i pęcherzyków nasiennych.

Juneja i wsp. (12) zaobserwowali natomiast u buhajów ze stanami zapalnymi pęcherzyków nasiennych zanik frakcji II i III oraz wzrost zawartości frakcji I białek plazmy nasienia rozdzielonych elektroforetycznie na octanie celulozy. Usunięcie pęcherzyków nasiennych powodowało jedynie zanik frakcji I. W badaniach makroskopowych narządu rozrodczego autorzy zauważyli, że stany zapalne pęcherzyków nasiennych zbiegały się ze zmianami w pozostałych narządach płciowych.

Tab. 1. Aktywność LDH w plazmie nasienia buhajów z normospermia oraz buhajów A i B ze stanami zapalnymi narządu rozrodczego

	Liczba prób	Plazma nasienia		
		Zawartość białka ogólnego g/100 ml	Aktywność LDH	
			jed. *) Wróblewskiego/ 1000 ml	jed. Wróblewskiego/ g białka
Normospermia	10	7,14	280,2	3,92
Buhaj A	5	2,94	179,3	6,48
Buhaj B	3	5,10	279,3	5,48

Objaśnienie: *) 1 jednostka Wróblewskiego — μ moles pirogronianu utworzonego w ciągu 1 minuty i temperaturze 293°K

W naszych badaniach stany zapalne obejmowały całe narządy rozrodcze a zmiany w elektroforegramach białek plazmy nasienia dotyczyły frakcji najszybciej wędrujących do anody, podobnych do albumin oraz alfa- i beta-globulin surowicy krwi. Zmiany obserwowane w białkach plazmy nasienia obu buhajów znalazły odzwierciedlenie również w elektroforegramach ekstraktów jąder i najądrzy. U buhajów z normospermia największe zróżnicowanie frakcji białkowych wystąpiło w ekstraktach ogona najądrzy podobnie do obserwacji podanych przez Almout i wsp. (1). Potwierdzałyby to doniesienie Lavona i wsp. (15) o szczególnej roli ogona najądrzy w metabolizmie białek. U buhaja B zaburzenia w obrazie frakcji białkowych obejmowały również frakcje strefy dodatkowej. Należy zaznaczyć, że ejakulatory uzyskane od tego buhaja charakteryzowały się oligospermia i necrospermia.

Wzrost zawartości RNA w cytoplazmie jąder i najądrzy tych buhajów wskazywałyby na ewentualną syntezę nowych białek. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku stanów zapalnych narządu rozrodczego tryka (19). W stanach zapalnych wywołanych eksperymentalnie u szczurów Delannoy i Bazin (6) stwierdzili wysokie tempo biosyntezy białek, głównie typu sjałoglikoproteidów.

Tab. 2. Aktywność LDH* w ekstraktach jąder i najądrzy buhajów z normospermia¹⁾ oraz buhajów A i B ze stanami zapalnymi narządu rozrodczego

Ekstrakt	Buhaje z normospermia	Buhaj A	Buhaj B
Jądro	438,7	1332,5	341,8
Głowa najądrza	347,4	Atrofia	442,1
Ogon najądrza	470,9		258,4

Objaśnienie: ¹⁾ wyniki analiz ekstraktów od 25 buhajów w wieku do 2 lat; *) jednostek Wróblewskiego na gram białka ekstraktu.

Należy przypuszczać, że w stanach zapalnych narządu rozrodczego zarówno aktywacja enzymów proteolitycznych, jak również zaburzenia w przepuszczalności błon komórkowych oraz nasilona synteza białek w silnie rozwijającej się tkance łącznej, są przyczyną zmiany właściwości fizyko-chemicznych i biochemicznych białek tkanek narządów rozrodczych i ich wydzielin. Uzyskane przez nas wyniki odnośnie LDH i jej izoenzymów potwierdzałyby to przypuszczenie.

Aktywność LDH w plazmie nasienia i ekstraktach tkanek narządu rozrodczego związana jest z frakcjami globulinowymi. Jak wiadomo różne formy molekularne tego enzymu syntetyzowane są pod kontrolą genetyczną (23). Obecność zaś w jądrach i w plemnikach (w odróżnieniu od tkanek somatycznych) szóstego izoenzymu LDH — X, pojawiającego się w miarę osiągnięcia dojrzałości płciowej przez samca, stworzyło możliwości śledzenia nie tylko przebiegu spermatogenezy, ale również metabolizmu i funkcji wydzielniczej gruczołów płciowych i jąder (10).

Robtol i wsp. (17) stwierdzili powiązanie aktywności izoenzymu LDH — X w plazmie nasienia człowieka z koncentracją plemników. Zanikanie tego izoenzymu następowało w przypadku niepłodności a szczególnie aspermii. Natomiast Eliasson i wsp. (8) wykazali wzrost aktywności izoenzymu LDH — 5 w tkankach dotkniętych nowotworem a zwłaszcza w przypadkach raka prostaty. Podobne rezultaty otrzymali u mężczyzn z dysfunkcją prostaty.

W naszych badaniach zaburzenia aktywności i enzymogramu LDH występowały szczególnie u buhaja A, u którego zmiany morfologiczne i histochemiczne narządu rozrodczego były nasilone. Brak izoenzymu LDH — 5 w plazmie nasienia wiąże się zapewne z aspermia, zaś osłabienie aktywności izoenzymu LDH — X w jądrach z zahamowaniem spermatogenezy. Obniżenie aktywności LDH w ogonie najądrzy buhaja B korelowało ze zmianami w elektroforegramach białek ekstraktu ogona najądrzy.

Podsumowując należy stwierdzić, że obok badań zawartości składników chemicznych, okresowe obserwacje elektroforegramów białek plazmy nasienia, badania aktywności niektórych białek enzymatycznych i ich enzymogramów (zwłaszcza LDH i fosfataz) mogą stanowić ważną informację w etiopatogenezie procesów chorobowych narządu rozrodczego. Zastosowanie do tych celów elektroforezy na żelu poliakrylamidowym byłoby najbardziej pomocnym ze względu na szybkie wykonanie analiz tą metodą.

Piśmiennictwo

1. Alumot E., Lensky Y., Schindler H.: J. Reprod. Fert. 25, 349, 1971.
2. Bagiński S.: Technika mikroskopowa, PWN, 1969.
3. Baibierz H., Nikolajczuk M., Senze A., Stehlik Z.: Pol. Arch. Med. wet. 14, 99, 1971.
4. Boryczko Z., Czaplak K., Furowicz A.: Medycyna Wet. 28, 349, 1972.
5. Davies B. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404, 1964.
6. Delannoy A., Bazin S.: Proc. Intern. Symp. Como, Italy 1968, Excerpta Medica Found. Amsterdam, 94, 1969.
7. Eliasson R.: Fert. Steril. 19, 344, 1968.
8. Eliasson R., Haggman K., Wiklund B.: Scand. J. clin. lab. Invest. 20, 535, 1957.
9. Ewew T., Zhivkov S., Popivanov R., Kehayov I., Podoplelov I. I., Glynsky I. A., Kryukov V.: Second Int. Symp. Immunol. Reprod. Varna, 1971.
10. Goldberg E.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 560, 1964.
11. Johnson M. H.: Second Int. Symp. Immunol. Reprod., Varna, 1971.
12. Juneja N. L., Faulkner L. C., Hopwood M. L.: Fert. Steril. 16, 361, 1965.
13. Korman M., Koskimies A. J.: Second Int. Symp. Immunol. Reprod., Varna, 1971.
14. Koskimies A. J.: Second. Int. Symp. Immunol. Reprod., Varna, 1971.
15. Lavon U., Volcani R., Danon D.: J. Reprod. Fert. 24, 219, 1971.
16. Rotkiewicz T.: Patomorfologia mięśni świń rasy Pietrain, rasy Złotnickiej Pstrej i ich mieszańców F₁ i F₂. Praca doktorska, WSR Olsztyn, 1971.
17. Rotbol L.: Hemmingsen L., Schmidt N.: Clinica chim. Acta 25, 147, 1969.
18. Strzeżek J.: Medycyna Wet. 25, 289, 1969.
19. Strzeżek J.: Medycyna Wet. 26, 480, 1970.
20. Suominen J., Satchell B. P.: J. Reprod. Fert. 30, 235, 1972.
21. Ungar G.: Proc. Intern. Symp. Como, Italy 1968, Excerpta Medica Found., Amsterdam, 3, 1969.
22. Wilkinson J. H., Withycombe W. A.: Biochem. J. 97, 663, 1965.
23. Wilkinson J. H.: Isoenzymes, London, 1965.

Adres autora: dr Jerzy Strzeżek, Olsztyn, Dworcowa 18 m 74.

Стшежек Е., Роткевич Т., Лиминович Ю. — Биохимические индикаторы в применении к оценке качества семени сельскохозяйственных животных. VI. Наблюдения за изменениями в белках плазмы семени быков страдающих воспалением полового аппарата.

У 2 быков больных воспалением полового аппарата установили при помощи электрофореза в полиакрилодовом желе качественные изменения в белковых фракциях плазмы семени и экстрактов яичек и их придатков. Изменения эти сопровождались расстройством активности молочной дегидрогеназы (LDH) и её изоэнзимов, а особенно LDH-5 и LDH-X. В гистохимических исследованиях установили рост активности РНК (RNA) в цитоплазме клеток яичек и их придатков у быков с воспалением полового аппарата. По мнению авторов причиной наблюдаемых биохимических изменений белков в выделениях и в тканях охваченного воспалительным процессом полового аппарата являются интенсивный синтез новых белков в развивающейся соединительной ткани (сильная реакция PAS и Gomori) и расстройства в проницаемости стен клеток.

Strzeżek J., Rotkiewicz T., Liminowicz J. — Biochemical indices applied to the determination of semen quality of domestic animals. VI. Alterations of semen plasma proteins in bulls with inflammatory changes in the genital tract.

In two bulls with inflammatory changes in the genital tract, by the use of electrophoresis in polyacrylamide gel there were noted qualitative changes in the proteinic fractions of plasma semen in the extracts of testicles and epididymis. The changes appeared along with some disturbances in the activity of lactic acid dehydrogenase (LDH) and its isoenzymes, especially LDH-5 and LDH-X. Histopathological examinations revealed an increase of RNA activity in the cytoplasm of testicle and epididymis cells of sick bulls. The authors suggest that the intensive synthesis of new proteins in the developing connective tissue (strong PAS and Gomori reactions) and disturbances in the permeability of cell membranes cause the biochemical changes in the proteins in excretions and tissues of the inflamed genital tract.

ALROY J.: Bazofilna białaczka u psa. (Basophilic leukemia in a dog). Vet. Path. 9, 90—95, 1972, (2).

Do kliniki małych zwierząt w Bernie przyprowadzono 8-letniego psa, u którego zdiagnozowano obecność licznych podskórnych guzków oraz powiększenie śledziony i węzłów chłonnych. Badanie krwi wykazało 3,5% myeloblastów, 1,0% promyelocytów, 4,0% myelocytów, 16% metamyelocytów, 57,5% neutrofilów, 5,0% eozynofiliów, 1,0% bazofiliów, 1,0% limfocytów i 6,5% monocytów. Badania elektroforetyczne surowicy przy użyciu testowej surowicy psa białaczkowego wykazały zanik frakcji IgM w surowicy badanej. Na sekcji psa poddanego eutanazji stwierdzono powiększenie obwodowych węzłów chłonnych, migdałków, grasicy, śledziony, guzki w wątrobie, nerkach, mięśniowce prawego serca, podśluzowce żołądka, błonie surowiczej jelit i w trzustce. Średnica guzków wahała się w granicach 0,2 do 2,0 cm. W szpiku kostnym i narządach wewnętrznych występowały nacieki niedojrzałych granulocytów. Komórki nowotworowe tworzyły również nacieki w śledzionie, wątrobie, nerkach, węzłach chłonnych, grasicy, migdałkach, ścianie przewodu pokarmowego, sercu, mięśniach szkieletowych, jądrach, prostatie i oponach mózgowych. Komórki nowotworowe cechowały się dużym polimorfizmem.

R.

SHIBLEY G. P., SALSURY D. L., DJURICKOVIC S. M., JOHNSON G.: Szczepienia do gruczołu młecznego w przypadku zakaźnego zapalenia żołądka i jelit świń. (Application of an intramammary route of vaccination against transmissible gastroenteritis in swine). Vet. med. small anim. clin. 68, 59—61, 1973 (1).

Czterdzieści siedem maciorek SPF i 90 normalnych zdrowych macior uodporniano do gruczołu młecznego szczepionką przeciwko zakaźnemu zapaleniu żołądka i jelit świń (TGE). Iniekcje szczepionki w ilości 10 ml wykonano dwukrotnie na 30 i 15 dni przed terminem oproszenia. Szczepionkę wprowadzano do cysterny strzykowej. Prosięta pochodzące od macior SPF zakażano 3 dnia życia szczepem Muller wirusa TGE, pozostałe prosięta eksponowano na zakażenie kontaktowe wirusem. Stwierdzono, że we krwi macior SPF miano przeciwciał neutralizujących dla wirusa TGE wynosiło po porodzie 1:288, u pozostałych macior 1:1447, zaś miano przeciwciał zobojętniających w siarze wynosiło odpowiednio 1:2636 i 1:3979. W mleku 4 dnia po porodzie osiągało ono wartość 1:621 i 1:2355. Odsetek przeżycia u prosiąt pochodzących od macior SPF szczepionych wynosił po zakażeniu zjadliwym szczepem wirusa 70%, u pozostałych prosiąt od macior normalnych szczepionych wynosił 84%, chociaż w doświadczeniach laboratoryjnych i terenowych uzyskiwano świetne efekty po szczepieniu do gruczołu młecznego. R.