

# FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JERZY STRZEZEK, JAN GLOGOWSKI

## Skład chemiczny plazmy nasienia zwierząt a stan układu rozrodczego

Z Instytutu Fizjologii i Biochemii Zwierząt AR-T w Olsztynie

Obecnie stosowane metody oceny nasienia, a pośrednio również stanu męskiego układu rozrodczego, oparte są głównie na określaniu wskaźników jakości nasienia oraz sporadycznie na badaniach niektórych testów metabolizmu jak: indeks fruktolizy, współczynnik zużycia tlenu.

Zaburzenia płodności prawie zawsze rozwijają się przy ustalonym zespole objawów klinicznych, przy czym mogą towarzyszyć im zaburzenia w zapłodnieniu komórki jajowej, których przejawem jest powtarzanie cyklu płciowego. Charakterystyczną cechą natomiast niepłodności bezobjawowej jest niemożliwość ustalenia przyczyny oraz objawów patognostycznych; jedynym objawem w tych przypadkach jest nieskuteczność unasieniania. Główną przyczyną nierozpoznawania czynników etiologicznych oraz objawów niepłodności bezobjawowej stanowi niedoskonałość metod badania klinicznego, biologicznego i laboratoryjnego.

Obok poznanych już zaburzeń biochemicznych w samych komórkach płciowych (obniżenie lub zwiększenie DNA, zmiany biochemiczne w akrosomie) wywołanych zarówno czynnikami genetycznymi jak również zmianami podklinicznymi w nabłonku rozrodczym, w ostatnim okresie dużą uwagę zwraca się na plazmę nasienia. Jej szczególna funkcja biologiczna w rozrodzie, kontrola hormonalna syntezy jej składników chemicznych pochodzących prawie ze wszystkich części układu rozrodczego, pozwalają traktować plazmę nasienia jako biochemiczny kompleks wydzielin tego układu. Aktywność wydzielnicza dodatkowych gruczołów płciowych i jąder korelują z ich stanem fizjologicznym.

Metody badań laboratoryjnych plazmy nasienia oparte są o jakościowe i ilościowe analizy poszczególnych składników chemicznych. Podzielić je można na:

1. ogólne testy biochemiczne, polegające na oznaczeniu zawartości określonych substancji chemicznych w plazmie,
2. biochemiczne metody badania białek,
3. immunologiczne analizy białkowych składników plazmy.

Spośród testów biochemicznych sprawdzonych jako przydatne dla oceny stanu układu płciowego wyróżnić należy: test kwasu cytrynowego, test fruktozowy, test wolnych aminokwasów oraz test kwasu sjałowego. Testy kwasu cytrynowego i fruktozy (10) znalazły za-

stosowanie w klinicznych przypadkach schorzeń narządów płciowych. Wykazano między innymi, że przerost lub rak prostaty korelują ze spadkiem zawartości kwasu cytrynowego w plazmie nasienia (12). Mann i wsp. (11) stwierdzili natomiast szybki spadek poziomu kwasu cytrynowego i fruktozy w plazmie nasienia przy stanach zapalnych jąder. Terapia antybiotykowa w tych przypadkach powodowała nie tylko powrót narządu do normalnej funkcji, ale również powrót do normy zawartości fruktozy i kwasu cytrynowego. Podobne zmiany u człowieka zaobserwowali Eliasson i wsp. (6) w przypadkach stanów zapalnych prostaty i gruczołów pęcherzykowych.

W ostatnich latach dużą uwagę przywiązuje się do obecności w plazmie nasienia wolnych aminokwasów. Wyjaśniono mianowicie, że zarówno spermatogeneza jak również dojrzewanie i ochrona plemników w najądrzu przebiega przy znacznej koncentracji wolnych aminokwasów, spośród których olbrzymią rolę odgrywa kwas glutaminowy, syntetyzowany w kanalikach nasieniowórczych (16). Pionierzy badań nad wolnymi aminokwasami w plazmie nasienia zwierząt Hopwood i Gassner (7) wskazali na wyraźną korelację poziomu kwasu glutaminowego w plazmie nasienia buhaja z dojrzałością układu rozrodczego.

Wprowadzenie do praktyki metody elektrochromatografii wysokonapięciowej (13) lub analizy przy pomocy automatycznych analizatorów aminokwasów, pozwoliło zastosować test wolnych aminokwasów jako wskaźnik stanu fizjologicznego układu rozrodczego a zarazem jakości ejakulatu.

Kwas sjałowy z kolei, wydzielany głównie przez gruczoły pęcherzykowe i najądrza, znajduje się pod kontrolą hormonu testosteronu (9). Zmiany jego zawartości koreluje z dojrzałością płciową osobników męskich (15). W świetle naszych badań jest on jednym z podstawowych składników chemicznych plazmy i warunkuje właściwości biochemiczne białek plazmy (23, 24). Test kwasu sjałowego może mieć dużą wartość diagnostyczną dla śledzenia nasienia procesów chorobowych narządów rozrodczych (24) oraz kriobiochemicznych zmian w przechowywanym nasieniu (22).

Gatunkowe różnice w składzie chemicznym plazmy oraz miejsca syntezy poszczególnych składników w układzie rozrodczym pozwalają wykorzystywać niektóre analizy biochemiczne do zlokalizowania procesu chorobowego w obrębie narządu rozrodczego. U człowieka na przykład wydzielinę prostaty cechuje duże stężenie kwasu cytrynowego i wysoka aktywność kwaśnej fosfatazy. Dla wydzieliny gruczołów pęcherzykowych charakterystyczny jest wysoki poziom

fruktozy. Ejakulatory azoospermiczne, pozbawione fruktozy lecz posiadające podwyższoną aktywność kwaśnej fosfatazy i wysokie stężenie kwasu cytrynowego, wskazywać mogą na nadmierną proporcję wydzielin prostaty i schorzeń tego gruczołu. Inną osobliwością ejakulatu człowieka i zwierząt jest wysoka koncentracja prostaglandyn. Spośród 30 prostaglandyn stwierdzonych w plazmie człowieka i tryka, PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> są dominującymi (5).

Źródłem prostaglandyn w nasieniu są gruczoły pęcherzykowe. Zaburzenia funkcji wydzielniczych tych gruczołów korelują ze zmianami aktywności pobudzającej skurcz mięśni gładkich narządów płciowych samicy przez plazmę nasienia.

Interesującą cechą aktywności wydzielniczej męskiego układu rozrodczego jest to, że w wielu przypadkach organy uważane przez anatomicznych jako „homologiczne” różnią się wyraźnie składem chemicznym ich wydzielin. Szczególnym tego przykładem jest układ rozrodczy knura. Jego cechy charakterystyczne to:

1. wysoka zawartość glicerofosfocholiny, hypotauryny w najądrzach,
2. występowanie ergotioneiny, inozytolu i kwasu cytrynowego w gruczołach pęcherzykowych,
3. produkcja przez gruczoły Cowpera sjałoproteidów, zawierających około 26% kwasu sjałowego.

Analiza tych substancji w plazmie knura dostarczyć może bardzo szybko jakościowych wskaźników stanu całego układu rozrodczego i poszczególnych jego odcinków.

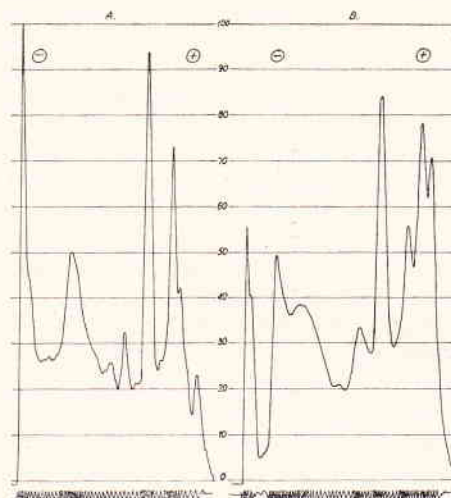
Osobnym problemem badawczym w zastosowaniu do oceny stanu fizjologicznego męskiego układu rozrodczego są badania nad białkami plazmy nasienia. Syntetyzowane pod kontrolą hormonów płciowych w dodatkowych gruczołach płciowych i jądrach stanowiąc mogą ważną informację o stanie czynnościowym narządów rozrodczych (2, 3, 4, 19, 20, 25). Heterogenność białek plazmy, podatność na zmiany ilościowe w zależności od stanu układu rozrodczego wskazują na możliwość zastosowania nowoczesnych metod biochemicznych badania białek dla diagnozowania i lokalizacji procesu chorobowego toczonego się miejscowo w narządzie rozrodczym (ryc. 1). Wymienić należy przydatne do tych celów metody elektroforezy niskonapięciowej w różnych nośnikach oraz sączenia na żelach Sephadex.

Specyficzność enzymatyczna plazmy nasienia uwarunkowana jest między innymi funkcją wydzielniczą jąder i poszczególnych gruczołów płciowych. Przykładowo, źródłem aminotransferaz w plazmie nasienia są najądrza i gruczoły pęcherzykowe (1) natomiast dehydrogenazy mleczanowej oraz fosfatazy alkalicznej i kwaśnej — głównie najądrza (14).

Zależność hormonalna i genetyczna syntezy enzymów w narządach rozrodczych, związaną

całkowitej aktywności niektórych z nich z plazmą nasienia, stworzyły możliwość wykorzystania badań enzymatycznych plazmy dla oceny stanu czynnościowego układu płciowego a nawet poszczególnych jego odcinków.

Niezmierne pomocnymi mogą być analizy zmian aktywności różnych form molekularnych enzymów tzw. izoenzymów. Istnienie takich form, różniących się strukturą 4-rzędową, ale wyrażających ten sam typ aktywności katalitycznej jest charakterystyczne także dla plazmy nasienia zwierząt. Obecność ich w białkach plazmy wiąże się z całym szeregiem aspektów pierwotnie genetycznych jak i późniejszych funkcjonalnych.



Ryc. 1. Zmiany proteinogramów plazmy nasienia tryka w stanach zapalnych jąder i najądrzy

Objaśnienia: (wykres densitometryczny na aparacie Vitatron Manual TLD 100); A = normospermia, B = stan patologiczny.

Izoenzymy różnią się właściwościami fizyczno-chemicznymi, co dostosowuje ich funkcję do potrzeb metabolicznych nasienia w zależności od lokalizacji (plemnik, plazma nasienia). Przykładem są formy dehydrogenazy mleczanowej (LDH), dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) oraz fosfatazy alkalicznej i kwaśnej. Fosfataza alkaliczna plazmy występuje np. w 2—3 formach izoenzymatycznych, których zarówno ruchliwość elektroforetyczna jak i właściwości katalityczne uzależnione są od obecności kwasu sjałowego (23).

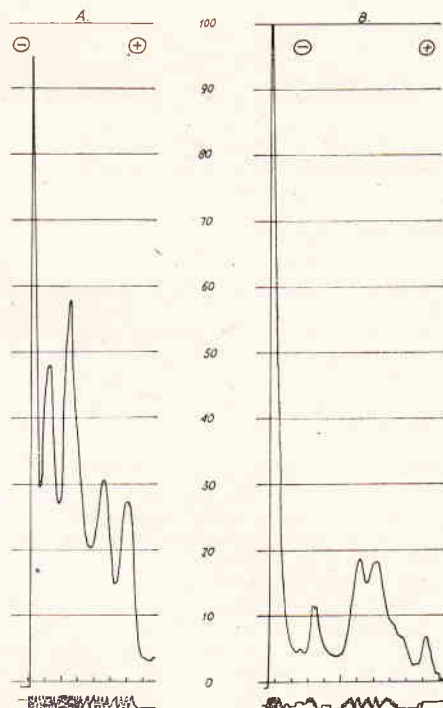
Zmiany izoenzymatycznych form plazmy nasienia są typowym przykładem epigenetycznych modyfikacji struktur białkowych, spowodowanych warunkami środowiska. Modyfikacje te polegają zapewne między innymi na: delecji części łańcucha peptydowego, zmianach potencjału oksydoredukcyjnego a także na przyłączeniu drobnocząsteczkowych związków do enzymu. Zwłaszcza zmiany przepuszczalności barier tkankowych zmienionego chorobowo narządu rozrodczego sprzyjają powstawaniu zmian degradacyjnych form molekularnych białek enzymatycznych plazmy.

Jako typowe przykłady zaburzeń form molekularnych białek plazmy można wymienić:

1. zmiana profilu izoenzymów LDH w przypadku stanów zapalnych narządu rozrodczego oraz uszkodzeń morfologicznych plemnika (ryc. 2),

2. zaburzenia ruchliwości elektroforetycznej form izoenzymatycznych fosfatazy alkalicznej w stanach chorobowych narządu rozrodczego, wyrażających się między innymi wzrostem poziomu kwasu sjałowego w plazmie,

3. wzrost aktywności formy mitochondrialnej MDH zwłaszcza przy necrospermii i teratospermii.



Ryc. 2. Zmiany profilu izoenzymów LDH plazmy nasienia tryka w stanach patologicznych układu rozrodczego

Objaśnienia: (wykres densitometryczny na aparacie Vitatron Manual TLD 100); A = normospermia, B = stan patologiczny.

Stosunkowo łatwe opanowanie technik specyficznych reakcji histochemicznych oraz metod elektroforezy niskonapięciowej w żelach stwarza możliwość szerokiego zastosowania badań izoenzymów plazmy nasienia jako metody rutynowej w Zakładach Higieny Weterynaryjnej.

Odrębność immunologiczna białek plazmy nasienia wynika z obecności w męskim układzie rozrodczym dwóch tkankowo swoistych systemów antygenowych:

systemu antygenowego jąder, najądrzy i plemników (26) oraz systemu antygenowego tkanek gruczołów dodatkowych i plazmy nasienia (17, 18).

Immunologiczne podłoże zaburzeń płodności jest spowodowane między innymi przeciwciałami w stosunku do białek antygenowych dodatkowych gruczołów płciowych. Charakterystycz-

ną cechą tych zaburzeń są zmiany mozaiki antygenowej plazmy jako wynik podwyższenia lub obniżenia poziomu frakcji białkowych z równoczesnym pojawieniem się frakcji patologicznych a zarazem labilnych (2, 19, 20, 21, 24). Najbardziej przydatnymi metodami do badań rutynowych i pomocniczych, stosowanych przy rozpoznawaniu i rokowaniu w procesach toczących się w obrębie narządu rozrodczego okazały się metody podwójnej dyfuzji w agarze według Ouchterlony oraz metoda immunoelektroforezy.

Przedstawione tylko niektóre praktyczne aspekty obserwacji składników chemicznych plazmy nasienia wskazują na duże możliwości określania stanu czynnościowego narządów rozrodczych. Należy podkreślić, że jedynie kompleksowe zastosowanie wymienionych metod i zróżnicowany zestaw badanych substancji chemicznych plazmy, w powiązaniu z objawami klinicznymi narządu rozrodczego, mogą decydować o poprawności rozpoznania przyczyny niepłodności męskiej.

Często bowiem otrzymane wyniki analiz substancji chemicznych obejmować mogą nie tylko składniki występujące w normalnej wydzielinie gruczołów dodatkowych ale także składniki samych plemników. Dotyczy to zwłaszcza białek enzymatycznych. Dla przykładu Harrison i White (8) wykazali, że plemniki i kropla cytoplazmatyczna uwalniają do plazmy enzymy glikolityczne w przypadku szybkiego schłodzenia nasienia od 30° do 0°C. Nasze obserwacje (dane niepublikowane) dotyczące aktywności aminotransferaz nasienia knura, wskazują na „przeleki” enzymów, zwłaszcza GOT z plemników do plazmy nasienia, w wyniku inkubacji nasienia w niskich temperaturach.

Zjawiska te, którym towarzyszy wzrost aktywności enzymów w plazmie wpływać mogą na obniżenie zdolności zapładniającej plemników. Problemami wpływu niskich temperatur na strukturę chemiczną plemnika zajmuje się coraz bardziej dynamicznie i wszechstronnie nowa dziedzina biochemii rozrodo tzw. kriobiochemia nasienia.

Należy przypuszczać, że wzajemne oddziaływanie struktur chemicznych wydzielin gruczołów dodatkowych i plemników stanowi istotę molekularnych podstaw mechanizmu niepłodności męskiej i patogenyzy chorób układu płciowego. Wynika stąd potrzeba dokonywania okresowych analiz niektórych składników chemicznych nasienia i wprowadzania do laboratoriów, zajmujących się praktycznymi problemami rozrodo, rutynowych metod biochemicznych.

Nasze sugestie w tym względzie oparte są o doświadczenia laboratoriów zarówno krajowych jak i zagranicznych.

#### Piśmiennictwo

1. Alumot E., Schindler H.: J. Reprod. Fert. 10, 261, 1965.
2. Balbierz H., Nikołajczuk A., Senze A., Stehlik L.: Pol. Arch. wet. 14, 99, 1971.
3. Boryczko Z., Czajka K., Furowicz A.: Medycyna Wet. 28, 349, 1972.

4. *Buruiana L. M., Hadarag E. L., Barbulescu J.*: Stidii si cercetarii biochim. Acad. R.P.R. 7, 163, 1964.
5. *Bygdeman M., Samuelsson B.*: Clinica chim. Acta 10, 566, 1964.
6. *Eliasson R., Molin L., Rajke G.*: Andrologie 2, 179, 1970.
7. *Hopwood M. L., Gassner F. X.*: Fert. Steril. 13, 290, 1962.
8. *Harrison R. A., White I. G.*: J. Reprod. Fert. 30, 105, 1972.
9. *Karagiannidis A.*: J. Reprod. Fert. 28, 121, 1972.
10. *Mann T.*: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen — London 1964.
11. *Mann T., Rowson L. E. A., Short R. V., Skinner J. R.*: J. Endocr. 38, 455, 1967.
12. *Marberger H., Marberger E., Mann T., Lutwak-Mann C.*: Br. med. J. i, 835, 1962.
13. *Minakowski W., Strzeżek J.*: Zesz. nauk. WSR Olsztyn 26, (1), 91, 1969.
14. *Murdoch R. N., White I. G.*: Aust. J. Biol. Sci. 21, 483, 1968.
15. *Rajalakshmi M., Prasad M. R. N.*: J. Reprod. Fert. 24, 409, 1971.
16. *Setchell B. P., Hinks N. T., Voglmayr J. K., Scott T. W.*: Biochem. J. 105, 1061, 1967.
17. *Shulman S., Mamrod L. M., Gonder M. J., Soanes W. A.*: J. Immun. 93, 474, 1964.
18. *Shulman S., Orsini F.*: Fert. Steril. 21, 794, 1970.
19. *Strzeżek J.*: Medycyna Wet. 25, 289, 1969.
20. *Strzeżek J., Rotkiewicz T., Liminowicz J.*: Medycyna Wet. 29, 479, 1973.
21. *Strzeżek J., Liminowicz J., Rotkiewicz T.*: Medycyna Wet. 29, 553, 1973.
22. *Strzeżek J., Glogowski J.*: Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol. z. 176, 95, 1975.
23. *Strzeżek J., Glogowski J.*: Some biochemical and immunological properties of alkaline phosphatase of ram seminal plasma. III Int. Symp. Immunol. Reprod., Varna 1975 (w druku).
24. *Strzeżek J.*: Zootechnika ART Olsztyn 7, 1, 1974.
25. *Szumowski P.*: Rec. Med. Vet. 135, 937, 1959.
26. *Voisin G. A., Toullet F.*: I Int. Symp. Immunol. Reprod. Varna 1967.

Adres autora: doc. dr habil. Jerzy Strzeżek, ul. Dworcowa 41 m. 90, 10-437 Olsztyn.

WOJCIECH RADOMIŃSKI, JAN ŻMUDZIŃSKI, ZDZISŁAW ŚWIĄTEK

## Stres niepokojenja ciężarnych macior a podatność prosiąt na doświadczalne zakażenie *E. coli*

Z Pracowni Badania Chorób Młodych Zwierząt Instytutu Weterynarii w Puławach

Ogólnie wiadomo, że warunki utrzymania macior w okresie ciąży wpływają na zdrowotność prosiąt po urodzeniu. Wyniki dotychczasowych badań wykazały wpływ niekorzystnych warunków utrzymania macior na resorpcję białka siary i gamma globulin siary z przewodu pokarmowego prosięcia noworodka, co powoduje stan hipoproteinemii i hipogammaglobulinemii (25.) Jak wskazują liczni autorzy, u prosiąt takich znacznie częściej występują zakażenia drobnoustrojami warunkowo chorobotwórczymi, które są przyczyną dość znacznych strat ekonomicznych (2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 24, 25). Ponieważ zwierzęta nie zawsze są hodowane w optymalnych warunkach środowiskowych, celem pracy było przebadanie wrażliwości na eksperymentalne zakażenie drobnoustrojami *E. coli* prosiąt pochodzących od macior poddawanych w drugiej połowie ciąży stresowi niepokojenja.

### Materiali i metody

Badania przeprowadzono na 22 prosiętach pochodzących od dwóch macior pierwiastek. Grupa doświadczalna liczyła 8 prosiąt o średniej wadze w dniu urodzenia 1,28 kg (1,21—1,35 kg). W grupie kontrolnej było 14 prosiąt o średniej wadze 0,84 kg (0,55—1,06 kg).

Stres niepokojenja macyory doświadczalnej oraz pomiary mikroklimatu pomieszczeń przeprowadzono podobnie jak w pracy Żmudzińskiego i wsp. (26). Krew od prosiąt doświadczalnych i kontrolnych pobierano w następującym porządku: tuż po urodzeniu, 2, 3, 10, 16 i 21 dnia po urodzeniu. Badanie bakteriologiczne krwi wykonywano posiewając 0,25 ml próbki na agar z krwią wg McConkeya. Surowice do badania uzyskiwano w ciągu 3—4 godz. od chwili pobrania próbek krwi i przechowywano w temperaturze —30°C. Oznaczano aktywność bakteriocydną, białko całkowite oraz poszczególne frakcje białkowe. Wymazy z prostrnicy prosiąt obu grup pobierano w następującej kolejności: po 3 godz., a następnie 2, 3 i 8 dnia po zakażeniu. Wymazy wysiewano na podłoża agarowe z krwią i podłoża McConkeya. Odczytów dokonywano po 24 godzin-

nej inkubacji w temperaturze 37°C. Do zakażenia zwierząt użyto szczepu *E. coli* O8:K87, K88 izolowanego z przypadków kolibakteriozy prosiąt, który otrzymano z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii. Prosięta doświadczalne i kontrolne zakażano 18 godziną hodowlą bulionową, podając po 0,5 ml wymienionego serotypu w 10 godzin po urodzeniu tj. po 3 karmieniu siarą.

Surowicę diagnostyczną anty *E. coli* dla antygenów OK przygotowano oraz agulatyngację szkiełkową wykonywano wg techniki podanej przez Sojkę (17).

Próbki siary i mleka pobierano w okresie porodu, a następnie 1, 2, 4, 14 i 20 dnia po porodzie. Serwatkę siary i mleka otrzymywano po uprzednim odtłuszczeniu i wytrąceniu kazein roztworem podpuszczki 1:10 000. Oznaczano białko całkowite i jego frakcje.

Aktywność bakteriocydną surowicy krwi prosiąt w stosunku do użytego szczepu *E. coli* określano w objętości 0,2 ml metodą płytkową bez dodatku komplementu egzogennego wg Barta i wsp. (3). Białko całkowite oznaczano metodą biuretową. Poszczególne frakcje białkowe oznaczano dokonując rozdziału elektroforetycznego i wyliczając ich stężenie z białka całkowitego.

### Wyniki

Cechy mikroklimatu pomieszczeń były następujące: średnie temperatury maksymalna i minimalna w pomieszczeniach dla macyory doświadczalnej i kontrolnej były podobne (+21°C i +20,3°C, +18,7°C i +17,4°C). Współczynnik ochładzania wynosił średnio 5,38 mcal/cm<sup>2</sup>/sek., a wilgotność względna 82,66% w pomieszczeniach doświadczalnych, w pomieszczeniu kontrolnym współczynnik ochładzania wynosił 5,25 mcal/cm<sup>2</sup>/sek., wilgotność względna 82,13%.

Poziom białka całkowitego w serwatce siary macyory doświadczalnej w dniu porodu (19,69 g/100 ml) był bardzo zbliżony do wartości stwierdzonej u macyory kontrolnej (19,63 g/100 ml). Już w drugim dniu po porodzie rozpoczynał się spadek poziomu białka całkowitego serwatki siary, przy czym był on większy u macyory doświadczalnej (9,22 g/100 ml wobec