

JERZY STRZEŻEK, TAHA JASSIM AL-TAHA, JADWIGA ŚMIGIELSKA, MARIA HOSAJA

Charakterystyka biochemiczna plemników buhaja po długookresowym przechowywaniu w ciekłym azocie *)

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

Przyjęty w kraju program oceny i selekcji buhajów zakłada, że kompleksowa ocena w kierunku ich przydatności jako reproduktorów trwa do 6—7 roku życia. Pobierane w tym okresie ejakulatory zostają zamrożone i przechowywane w ciekłym azocie do momentu zakończenia oceny dzielności użytkowej i reprodukcyjnej.

Piśmiennictwo dotyczące wartości biologicznej nasienia buhajów, po długotrwałym okresie przechowywania prób w niskich temperaturach, jest stosunkowo skromne. Niektórzy autorzy sygnalizują jednak możliwość powstania kriobiochemicznych zaburzeń w obrębie białek enzymatycznych akrosomu i wstawki oraz nukleoproteidach główki plemników. Powyższe zmiany stanowią mogą przyczynę obniżonej zdolności zapładniającej nasienia, jak również zwiększenia śmiertelności zarodkowej.

Według Salisburyskiego i Harta (6) obniżenie temperatury przechowywania nasienia z $+4^{\circ}\text{C}$ do -196°C nie zapobiega zmianom denaturacyjnym w nukleoproteidach główki plemnika, a jedynie opóźnia ich powstawanie. Uszkodzeniom tym towarzyszy zwiększona śmiertelność zarodkowa, którą zaobserwowano po unasiennianiu przeprowadzonych nasieniem przechowywanym zaledwie przez rok (5).

Badania Andersen i Pedersen (1) wykazały 3% obniżenie zdolności zapładniającej nasienia buhajów, przechowywanego 5 lat w stanie zamrożonym. Podobne obserwacje poczynili Nishikawa i wsp. (3) badając nasienia przechowywane ponad 6 lat w temperaturze -196°C . Autorzy ci nie stwierdzili jednak istotnych zmian w ruchliwości plemników, pochodzących z prób nasienia przechowywanego przez okres 4—13 lat w stosunku do obserwowanej w nasieniu bezpośrednio po jego zamrożeniu i rozmrożeniu.

Stewart i wsp. (7) wykonując doświadczenie nad heterospermiczną inseminacją mrożonym nasieniem pochodzącym od 4 buhajów wykazali, że ojcem aż 50% urodzonego potomstwa był tylko jeden buhaj.

Przytoczone dane przemawiają za indywidualną podatnością plemników niektórych buhajów na biochemiczne zmiany starzeniowe, spowodowane długoterminowym przechowywaniem nasienia w niskich temperaturach.

Przeprowadzone przez nas badania stanowią próbę określenia zmian biochemicznych w plemnikach, w zależności od czasu przechowywania nasienia buhajów w ciekłym azocie.

Materiał i metody

Próby nasienia magazynowane w ciekłym azocie, w różnie długich okresach czasu, uzyskano dzięki uprzejmości kierownictwa Centralnego Banku Nasienia w Bałicach.

Analizy biochemiczne dotyczyły 41 prób nasienia przechowywanego od 1—12 lat (3—4 próby dla każdego roku magazynowania). Bezpośrednio po rozmrożeniu nasienia w temperaturze 38°C (bez dodatku roztworu fizjologicznego) oraz określeniu ruchliwości plemników wykonywano oznaczenia aktywności hialuronidazy i aminotransferazy asparaginianowej (GOT) w płynach nadosadowych, aktywności akrosyny w kwaśnych ekstraktach plemników oraz wartości współczynnika ZO_2 . Metodyka w/w oznaczeń przedstawiona została w naszych wcześniejszych opracowaniach (8, 9).

Uzyskane w badaniach aktywności enzymów podano w jednostkach na 10^9 plemników, zaś wartości współczynnika ZO_2 w $\mu\text{l O}_2$ pobranego przez 10^8 plemników w ciągu 1 godz. w temperaturze 37°C . Rezultaty badań biochemicznych otrzymane dla nasienia długoterminowo przechowywanego w niskiej temperaturze porównywano z wynikami wcześniej wykonanej, szczegółowej analizy biochemicznej nasienia buhaja po 24 godz. przechowywania w ciekłym azocie (11).

Wyniki i omówienie

Różna zdolność zapładniająca nasienia buhajów, przechowywanego przez długi okres czasu w ciekłym azocie przemawiać może za postępującym, w miarę wydłużania czasu składowania prób, procesem obumierania plemników lub zmianami biochemicznymi zachodzącymi w ich strukturach. Według Jaśkowskiego (2) dwudniowa konserwacja nasienia w temperaturze -79°C prowadzi do obumierania 3—5% plemników, zaś w ciągu 30 dni ginie około 10% tych komórek. Dotychczasowe doświadczenie produkcyjne wskazują na stopniowe obniżanie zdolności zapładniającej nasienia przechowywanego w ciekłym azocie przez okres dłuższy niż 5—6 lat. Przypuszczalnie wiąże się to z zachodzącym w przebiegu konserwacji zjawiskiem wyciekania białek enzymatycznych, uczestniczących w procesie zapłodnienia komórki jajowej, z plemników do środowiska (10).

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że określenie intensywności „wycieku” hialuronidazy i akrosyny z plemników do osocza służyć może jako biochemiczny sprawdzian stanu błon akrosomu, zaś stopień uwalniania aminotransferazy asparaginianowej i zmiany współczynnika

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

ZO₂ charakteryzują zaburzenia zachodzące w obrębie wstawki. Oznaczanie wyżej wymienionych parametrów przyjęto więc za podstawę przeprowadzonej w niniejszym doświadczeniu oceny biochemicznej nasienia przechowywanego przez długi okres czasu.

Ze względu na stosunkowo niewielką liczebność prób, odpowiadających różnie długim okresom przechowywania nasienia w ciekłym azocie, uzyskany materiał doświadczalny podzielono na dwie grupy, a mianowicie: ejakulatory przechowywane od 1 do 6 lat (22 próby) oraz od 7 do 12 lat (20 prób).

W tab. 1 i 2 porównano badane parametry nasienia świeżo zamrożonego, przechowywanego przez 1—6 oraz 7—12 lat.

W obu partiach nasienia przechowywanego przez wiele lat stwierdzono po zamrożeniu znacznie większe stężenie akrosyny w środowisku niż w nasieniu badanym 24 godziny po zamrożeniu, w którym nie różniło się ono wiele od stężenia wyjściowego. Powyższe dane wydają się wskazywać na znaczne zmiany przepuszczalności lub uszkodzenia struktury wewnętrznej błony akrosomu, powstałe w wyniku długotrwałego przechowywania nasienia w niskiej temperaturze.

W badaniach dotyczących oznaczania aktywności hialuronidazy obserwowano znaczne różnice w stopniu uwalniania tego enzymu z plemników do plazmy, zależne od czasu konserwacji prób. Stanowią one przypuszczalnie wynik postępującej degradacji męskich komórek płciowych, obumarłych w pierwszych dniach po zamrożeniu nasienia. Według von Holzmann i wsp. (12) istnieje bowiem wyraźna dodatnia korelacja pomiędzy ilością hialuronidazy uwalnianej z plemników do plazmy nasienia a odset-

Tab. 1. Wskaźniki biochemiczne charakteryzujące stan akrosomów plemników nasienia krótko- i długoterminowo przechowywanego w ciekłym azocie

	Plemniki składowane					
	24 h n = 120		do 6 lat n = 22		7-12 lat n = 20	
	Akrosyna mJ/10 ⁶	Hialuronidaza j/10 ⁹	Akrosyna mJ/10 ⁶	Hialuronidaza j/10 ⁹	Akrosyna mJ/10 ⁶	Hialuronidaza j/10 ⁹
\bar{x}	137,34 (123,14)	16,24 (10,50)	164,42	5,91	167,74	10,35
Sx	77,44 (64,81)	4,57 (5,46)	46,94	2,76	57,50	5,86
V	56,39 (52,63)	28,10 (52,00)	28,55	46,66	34,28	56,66

Objaśnienie: w nawiasach podano wartości uzyskane dla plemników nasienia świeżego, bezpośrednio po jego rozcieńczeniu.

Tab. 2. Wskaźniki biochemiczne charakteryzujące stan wstawki plemników nasienia krótko- i długookresowo przechowywanego w ciekłym azocie

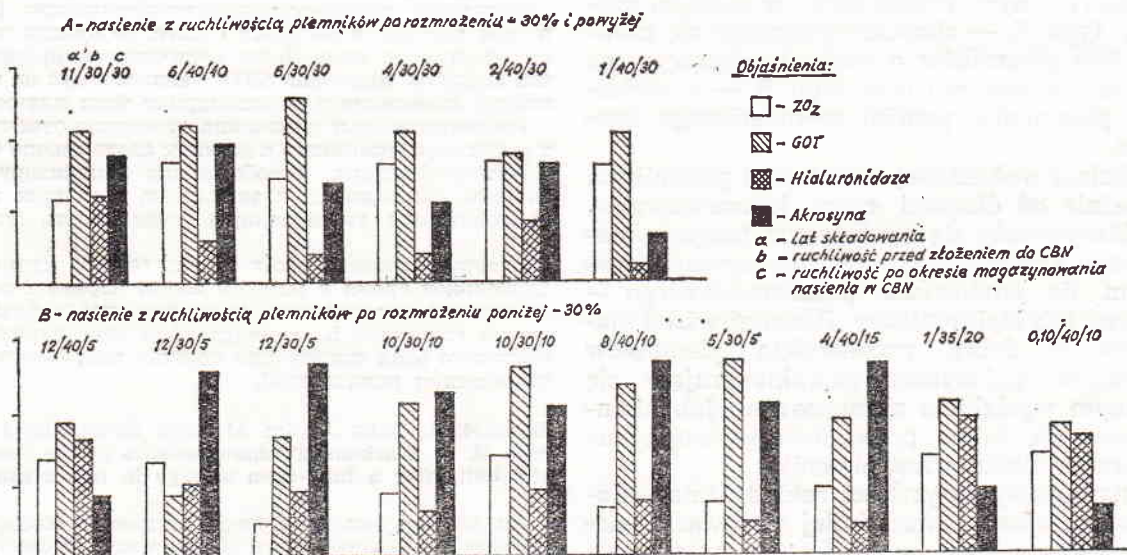
	Plemniki składowane					
	24 h n = 120		do 6 lat n = 22		7-12 lat n = 20	
	ZO ₂	GOT j/10 ⁹	ZO ₂	GOT j/10 ⁹	ZO ₂	GOT j/10 ⁹
\bar{x}	15,66 (28,50)	342,30 (185,94)	10,99	212,72	7,57	194,15
Sx	7,25 (9,73)	102,45 (80,33)	5,99	103,75	4,09	41,50
V	46,29 (34,03)	29,93 (43,22)	54,58	48,77	54,14	21,37

Objaśnienie: jak do tab. 1.

Tab. 3. Ruchliwość plemników po rozmrożeniu nasienia konserwowanego w ciekłym azocie

	Plemniki składowane do 6 lat n = 22		Plemniki składowane, 7-12 lat n = 20		
	Ruchliwość (%)	Ruchliwość przed zmagazynowaniem w CBN	Ruchliwość po okresie składowania	Ruchliwość przed zmagazynowaniem w CBN	Ruchliwość po okresie składowania
\bar{x}	27,14 (73,95)	35,27	12,50	33,94	9,47
Sx	10,41 (5,08)	4,99	9,89	7,56	5,01
V	38,34 (6,87)	14,15	79,11	22,27	52,94

Objaśnienie: jak do tab. 1.



Ryc. 1. Charakterystyka biochemiczna niektórych prób nasienia długookresowo przechowywanego w ciekłym azocie ze zróżnicowaną ruchliwością plemników po rozmrożeniu

kiem nieruchliwych plemników. Wymienieni autorzy nie stwierdzili podobnej zależności między ilością uwolnionego enzymu a liczbą plemników zmienionych morfologicznie.

Przeprowadzone badania odnośnie stanu wstawki plemnika wykazały stosunkowo słaby „wyciek” aminotransferazy asparaginianowej. Przypuszczalnie omawiany enzym ulega inaktywacji cieplnej, zachodzącej bezpośrednio po jego uwolnieniu z plemników. Wyraźne obniżenie jednak wartości współczynnika ZO_2 dla plemników obu grup przechowywanego nasienia przemawiać może za kriogennymi zmianami, powstałymi w mitochondriach tych komórek.

Krioliza mitochondriów prowadzi zwykle do obniżenia zużycia tlenu przez plemniki oraz zwolnienia procesów syntezy związków wysokoenergetycznych. Zaburzeniom tym towarzyszy mniejsze przeżywalności plemników (4).

W przeprowadzonych badaniach najwyższe spadki zużycia tlenu stwierdzono dla plemników pochodzących z nasienia magazynowanego w ciekłym azocie przez okres dłuższy niż 6 lat. Zjawisku temu towarzyszyło wyraźne zmniejszenie ruchliwości plemników obserwowane po rozmrożeniu prób (tab. 3).

Powszechnie stosowanym w zakładach unasienniania kryterium przydatności nasienia zamrożonego do inseminacji jest stwierdzenie po rozmrożeniu minimum 30% plemników o ruchu postępowym. Kryterium to nie zawsze zdaje egzamin w praktyce inseminacyjnej. Plemniki po rozmrożeniu, wskutek zmian ultrastrukturalnych tracą szybko w trakcie procesu kapacytacji w żeńskich drogach płciowych zdolność do zapłodnienia komórki jajowej. Należy przypuszczać, że zjawisku temu towarzyszy intensywne uwalnianie enzymów plemnika do środowiska zewnątrzkomórkowego.

Ryc. 1 przedstawia wyniki analiz biochemicznych, uzyskanych dla dwóch typów ejakulatów, przechowywanych różnie długo w ciekłym azocie: tj. typu A — charakteryzującego się minimum 30% plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu nasienia oraz typu B — o ruchliwości plemników poniżej wymienionego kryterium.

Ejakulatory o obniżonej ruchliwości plemników, niezależnie od długości czasu konserwowania, charakteryzowały się zwolnionym tempem metabolizmu komórkowego oraz intensywnym wyciekaniem do środowiska pozakomórkowego — akrosyny lub hialuronidazy. Również wśród ejakulatów z dobrą ruchliwością plemników stwierdzono pojedyncze, charakteryzujące się nasilonym wyciekaniem akrosynowym lub hialuronidazowym, mimo prawidłowego tempa zużycia tlenu przez plemniki.

W najbliższej przyszłości zakłady unasienniania zaczną coraz powszechniej stosować nasienie przetrzymywane w banku nasienia przez okres 4—5 lat, zgodnie z nowymi założeniami selekcji buhajów inseminacyjnych. Będzie to

wymagało stosowania bardziej precyzyjnych od dotychczas stosowanych metod oceny nasienia. Zgodnie z naszymi obserwacjami obok badań ruchliwości plemników po rozmrożeniu prób nasienia, należałoby indywidualnie charakteryzować te komórki przy pomocy wybranych wskaźników biochemicznych. Najbardziej przydatnymi do tego celu wydaje się być oznaczenie współczynnika ZO_2 oraz intensywności „wycieku” akrosynowo-hialuronidazowego. Potwierdzenie powyższych sugestii wymaga jednak przeprowadzenia badań na większym materiale doświadczalnym.

Piśmiennictwo

1. Andersen J. B., Pederson H.: Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem., Cracow, 4, 783, 1976.
2. Jaśkowski L.: Postępy Nauk Rol. 55, 55, 1969.
3. Nishikawa Y., Iritani A., Shiryama K., Tarao T.: Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. and Artif. Insem. Cracow, 4, 838, 1976.
4. Pace M. M., Graham E. F.: Biology Reprod. 3, 140, 1970.
5. Salisbury G. W.: Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod., Paris 2, 1189, 1968.
6. Salisbury G. W., Hart R. G.: Biology Reprod., suppl. 2, 1, 1970.
7. Stewart D. L., Spooner R. L., Bennett G., Beaty R. A.: J. Reprod. Fert. 36, 107, 1974.
8. Strzeżek J., Śmigiełska J., Taħa Jassim Al-Taħa: Wpływ różnych temperatur na uwalnianie enzymów z plemników buhaja podczas zamrażania i rozmrażania nasienia. Medycyna Wet. (w druku).
9. Strzeżek J., Śmigiełska J., Czezoł H., Taħa Jassim Al-Taħa, Głogowski J., Łaminowicz J.: Kriobiochemiczne zmiany w nasieniu buhaja, tryka i knura. Mat. XV Sesji PTNW, Poznań 1977 (w druku).
10. Strzeżek J.: Białka enzymatyczne akrosomu plemnika i ich funkcja w procesie zapłodnienia komórki jajowej. Medycyna Wet. (w druku).
11. Taħa Jassim Al-Taħa: (dane nieopublikowane).
12. von Holzmann A., Strahl H., Jahn J., Bamberg E.: Zucht-hyg. 13, 121, 1978.

Adres autora: doc. dr hab. Jerzy Strzeżek, bl. 37 p. 230, 10-718 Olsztyn-Kortowo.

Стшежек Е., Яссим Аль-Тага, Сьмигельская Я., Го-сая М. — Биохимическая характеристика живчиков быка после длительного хранения в жидком азоте.

Предприняли попытку определения биохимических изменений в живчиках семени, хранимого в жидком азоте 1—12 лет.

Констатировали, что после разморозения живчики, хранимые долгосрочно, отличаются наклоном к освобождению акросина и гиалуронидазы. Хотя „вытекание” глутаматаспартаттрансаминазы (GOT) в этих случаях отмечается слабее, то однако заметно отчетливое понижение величины коэффициентов дыхания живчиков (ZO_2), указывающее на криогенные изменения в митохондриях этих клеток.

Рассматриваемые изменения отчетливо отмечались в живчиках, хранимых в жидком азоте свыше 6 лет.

Интенсификация освобождения анализируемых энзимов наблюдается в эякулятах, имеющих после разморозения уменьшенную подвижность живчиков.

Авторы внушают, что в случае семени, хранимого длительное время в жидком азоте, наряду с исследованиями подвижности живчиков после разморозения следовало бы индивидуально характеризовать состояние этих клеток при помощи избранных биохимических показателей.

Strzeżek J., Taħa Jassim Al-Taħa, Śmigiełska J., Ho-saja M. — Biochemical characteristics of the sperm of the bull after a long-term storage in liquid nitrogen.

An attempt has been made to specify biochemical changes in spermatozoons of the sperm preserved in liquid nitrogen for 1 to 12 years. After their defrostation a strong tendency to release acrosine and hyaluronidase was observed in spermatozoons preserved for

a long time. Although the „leakage” of asparaginic aminopherase (GOT) is weaker in these cases, a distinct decrease in the value of respiration coefficients of the spermatozoons (ZO₂) points to cryogenic changes in the mitochondria of these cells.

The changes discussed were strongly marked on spermatozoons preserved in liquid nitrogen longer than 6 years.

Intensified release of the enzymes studied is observed in ejaculates showing reduced mobility of spermatozoons after defrostation.

The authors suggest that apart from the studied mobility of spermatozoons after defrostation when investigating sperm preserved in liquid nitrogen for a long time, the condition of individual cells should be characterized in terms of selected biochemical indices.

ANATOMIA I FIZJOLOGIA ZWIERZĄT

MAREK JASTRZĘBSKI, JANUSZ WELENTO, STANISŁAW FLIEGER, MIROSLAW ŁAKOMY

Jądro oliwki (Nucleus olivaris) — ruchowy ośrodek skojarzeniowy rdzenia przedłużonego wielbłąda (*Camelus dromedarius* L.) w ujęciu czynnościowym i porównawczym

Z Instytutu Anatomii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

W pracy opisano budowę jądra oliwki (*Nucleus olivaris*) u dromadera (*Camelus dromedarius* L.). Piśmiennictwo dotyczące budowy tego jądra zwierząt domowych, jak też dziko żyjących jest obszerne. Obejmuje ono opis jądra u zwierząt kopytnych domowych (5, 6, 7, 12), dziko żyjących sarny i dzika (13, 14, 17), mięsożernych (15, 18), a także u nutrii, królika i świnki morskiej (3, 8, 11). Badania prowadzono również nad połączeniami jądra oliwki i jej rozwojem (1, 9, 19).

Przeprowadzone badania wykazały, że budowa tego ważnego ośrodka skojarzeniowego pozostaje w ścisłym związku z zakresem ruchomości kończyn, kręgosłupa i koordynacją ruchów. Może być więc interesujące porównanie budowy jądra oliwki wielbłąda — przeżuwacza będącego inochoodem, a więc wyróżniającego się sposobem poruszania z tej grupy zwierząt.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły dwa rdzenie przedłużone utrwalone w formalinie i alkoholu o stężeniach wzrastających i następnie zatopione w parafinie. Poprzecznie skrawki grubości 15 μm barwiono fioletem krezylowym wg metody Klüvera i Barrery.

Wyniki

Kompleks jąder oliwki wielbłąda zbudowany jest podobnie jak u innych gatunków z trzech części: jądra oliwki (*nucleus olivaris*), jądra dodatkowego przyśrodkowego oliwki (*nucleus olivaris accessorius medialis*) i jądra dodatkowego grzbietowego oliwki (*nucleus olivaris accessorius dorsalis*).

Zespół jąder oliwki rozciąga się od przedniej granicy skrzyżowania piramid do płaszczyzny poprzecznej, poprowadzonej w odległości około 6 mm do przodu od *obex*. Długość całego kompleksu jąder wynosi około 12,8 mm. Tak więc w części pozakomorowej rdzenia przedłużonego leży około 53% całości.

Jądro oliwki jest dużym skupieniem komórek, ułożonym pomiędzy blaszką dolną jądra dodatkowego przyśrodkowego oliwki, a jądrem dodatkowym grzbietowym oliwki. Rozpoczyna się nieco ku przodowi od przedniego bieguna kaptura grzbietowego Kooya, a kończy się wspólnie z jądrem dodatkowym grzbietowym oliwki, w niewielkiej odległości ku tyłowi od przedniego bieguna jądra dodatkowego przyśrodkowego. Tylny odcinek (około 1/5) ma na przekroju poprzecznym początkowo zarys zaokrąglony, bardziej ku przodowi, w miarę wzrostu ilości komórek — trójkątny (ryc. 2), a wreszcie owalny. Na tej wysokości przyśrodkowo od jądra oliwki pojawia się wąskie pasmo komórek. Oba pasma po krótkim przebiegu łączą się i od tego miejsca jądro oliwki tworzą dwa ramiona: ramię górne — *brachium superior* i ramię dolne — *brachium inferior* (ryc. 3). Ramię górne na przekroju poprzecznym jest krótkie i około 3-krotnie grubsze od ramienia dolnego. Oba ramiona rozdzielone są wąską bezkomórkową wnęką (*hilus nuclei olivaris*). Mniej więcej w połowie długości jądra oliwki ramię górne łączy się wąskim mostem komórkowym z przyśrodkową krawędzią jądra dodatkowego grzbietowego. Ramię górne jest tu najsilniej rozwinięte. Przedni odcinek — 1/5 — nie wykazuje już podziału na ramiona. W tej