

В остальных временных интервалах (3, 6 и 9 сутки) в общем отмечается постепенное понижение концентрации вольфрама-185 в исследуемых пробах.

Анализ содержания радиовольфрама в помете показал его интенсивное удаление до 48 часов опыта, в следующие временных интервалах с 3 по 9 сутки было удалено ок. 1/5 введенной дозы.

Nowosad R., Simoni J., Kubok-Gottlieb E. — **Localization and dynamic of Wolfram-185 excretion in chickens polluted parenterally**

The studies concern the behaviour of radioisotope of Wolfram-185 in chickens after its intravenous in-

jection. Time of experiments lasted 9 days. The highest concentration of Wolfram-185 in the examined organs and tissues was observed in the first 24 h of the experiment (the highest concentration in bones then in suprarenal glands, thymus, kidneys, livers, faethers, testes, skin and eyes). In the remaining periods of observation (after 3, 6 and 9 days), generally, a stepwise decrease of the content of Wolfram-185 in the examined tissues is observed. Analysis of the content of Wolfram-185 in faeces revealed that it was intensively excreted up to 48 h of the experiment, and that from 3 to 9 day about 1/3 of the initial dose of Wolfram-185 was excreted.

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

HANNA CZECZOT, JERZY STRZEZEK

Heterogenność deoksyrybonukleaz układu rozrodczego buhaja i knura^{*)}

Katedra Biochemii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego ART 10-718 Olsztyn-Kortowo, bl. 37.

Deoksyrybonukleazy (DNazy), mimo określenia ich funkcji w procesach replikacji, genetycznej rekombinacji i restrykcji DNA, w dalszym ciągu są enzymami niedokładnie poznanyimi (5, 9).

DNaza I-zasadowa (EC.3.1.4.5) oraz DNaza II-kwaśna (EC.3.1.4.6), występujące w większości tkanek i płynów ustrojowych, okazały się enzymami heterogennymi, wykazującymi znaczne różnicowanie gatunkowe dotyczące właściwości fizykochemicznych, specyficzności substratowej, sposobów hydrolizy i współdziałania z inhibitorami (5, 9). W przypadku nasienia aktywność DNaz zidentyfikowano w plazmie człowieka, psa, królika, tryka i buhaja (11). Natomiast Cordonier i Bernardi (1) opisali niektóre właściwości DNazy II plazmy nasienia buhaja. Z kolei Hanada i Nagase (3) zidentyfikowali aktywność omawianych enzymów w płynach ogona najądrza i bańki nasieniowodu buhaja, wiążąc zarazem ich funkcje z eliminacją słabych i zestarzałych plemników. Wniosek powyższy wydają się potwierdzać również badania Lachnera i wsp. (7, 8), którzy w przypadku nasienia człowieka zawierającego znaczny odsetek plemników zmienionych, wykazali niską aktywność DNaz w plazmie nasienia w porównaniu do normospermii. Niewiele jest danych dotyczących heterogenności DNaz nasienia i tkanek układu rozrodczego zwierząt. Jedynie Georgiew i wsp. (2) stosując metodę mikroelektroforezy w żelu poliakrylamidowym

stwierdzili 2 formy enzymów w plazmie nasienia buhaja.

Celem badań było określenie heterogenności elektroforetycznej DNaz nasienia oraz tkanek i płynów układu rozrodczego buhaja i knura.

Materiał i metody

Nasienie do badań uzyskiwano od buhajów rozplodowych rasy cb oraz knurów rasy wb i pbz. Bezpośrednio po pobraniu ejakulatów dokonywano oceny wstępnej ich jakości, a następnie odwirowywano przez 15 min przy 4000×g w temperaturze 20—25°C. Plazmę nasienia przechowywano do czasu analiz w temp. —20°C. Poszczególne odcinki układu rozrodczego (jądra, najądrza, gruczoły pęcherzykowe) pozyskiwano od zwierząt bezpośrednio po uboju. Skrawki tkanek homogenizowano od zwierząt bezpośrednio po uboju. Skrawki tkanek homogenizowano przez 10 min w homogenizatorze szklanym umieszczonym w łaźni lodowej. Uzyskane wodne homogenaty wirowano przez 30 min przy 10 000 g. Osad odrzucano, zaś supernatanty zamrażano. Płyn z ogona najądrzy uzyskano przez wyciskanie. Po odwirowaniu przez 15 min przy 5000×g płyn znad osadu zachowywano do dalszych analiz. Ze względu na trudności z uzyskaniem materiału doświadczalnego nie otrzymano płynów — pęcherzykowego i najądrzowego buhaja.

Badania biochemiczne dotyczyły:

- określenia zawartości białka całkowitego metodą biuretową wg Weichselbauma (13),
- oznaczenia aktywności DNazy zasadowej i kwaśnej wg metody Kurnick (6),
- rozdziłów elektroforetycznych plazmy nasienia i uzyskanych uprzednio płynów wraz z identyfikacją histochemiczną form molekularnych DNaz wg metody Neuhoffa (10).

W tym ostatnim przypadku rozdziłów elektroforetycznych dokonywano metodą mikroelektroforezy w 13,4% żelu poliakrylamidowym z DNA jako substratem. Do badań używano DNA natywnego oraz DNA zdenaturowanego. Uzyskane żele poddawano 1—2 h inkubacji w temp. 37°C w mieszaninach o pH 5,0; 7,4 oraz 8,5 w czasie 1—2 h. Formy molekularne DNaz

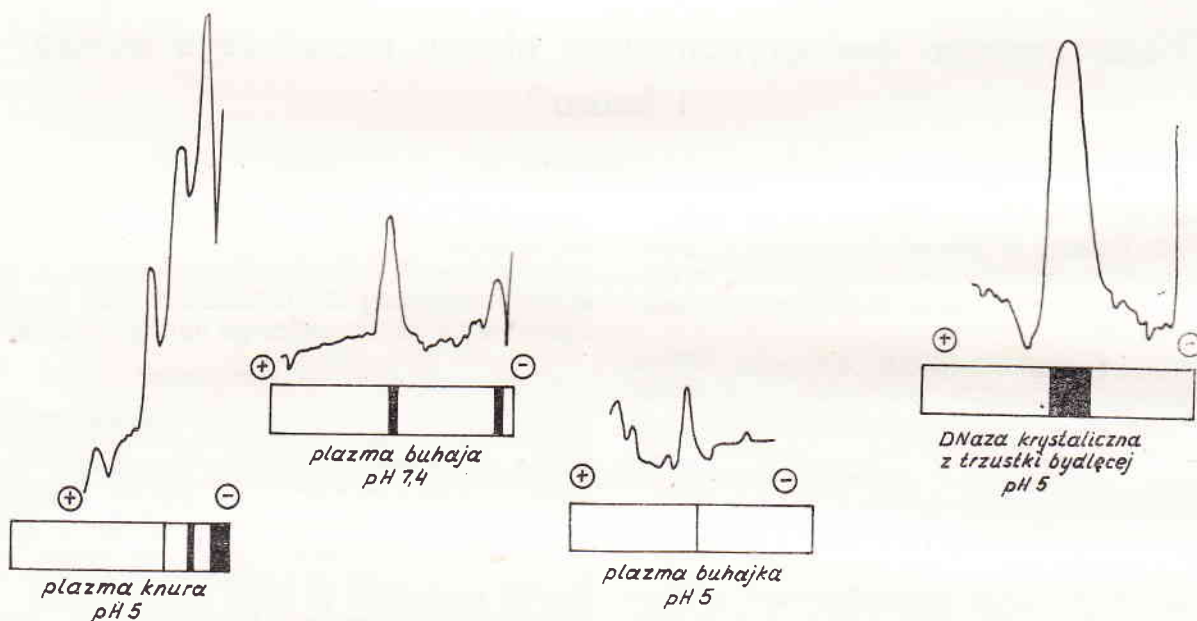
^{*)} Pracę wykonano w ramach problemu MR.II.10 pt.: „Fizjologia i patologia rozmnażania i okresu neonatalnego jako podstawy wzrostu produkcji zwierzęcej”.

Tab. 1. Aktywność DNazy I i DNazy II w homogenatach wodnych poszczególnych odcinków układu rozrodczego buhaja i knura, ($U \times 10^{-4}/mg$ białka)

Badane zwierzęta	Jądra		Najądrza						Gruczoły pęcherzykowe		Płyn pęcherzykowy		Płyn z ogona najądrzy	
			głowa		trzon		ogon							
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II		
Buhaje	3,04	3,72	0,17	2,23	0,06	0,79	0,13	4,11	0,13	0,45	nie oznaczano			
	0,22	0,82	0,03	0,83	0,04	0,57	0,10	3,38	0,09	0,18				
Knury	0,59	2,49	0,94	0,24	0,66	2,38	1,72	3,77	ślady	0,86	0,16	0,66	0,49	2,45
	0,42	0,85	0,37	1,41	0,36	1,24	1,53	1,68		0,48	0,09	0,19	0,25	0,54

Tab. 2. Aktywność DNaz w ekstraktach plemnikowych i plazmie nasienia knura i buhaja; ($U/cm^3 \times 10^{-4}$)

Białko ogólne DNazy:	Ekstrakt plemników				Plazma nasienia					
	knury		buhaje rozplodowe		knury		buhaje			
							do 2 lat		rozplodowe	
mg/cm ³	68,75	19,23	85,08	23,99	56,57	11,13	107,60	36,49	92,00	20,00
zasadowa	4,17	0,98	8,08	4,42	47,97	30,06	36,95	8,64	38,20	18,60
kwaśna	38,59	25,48	10,19	5,53	111,50	70,77	259,99	97,58	149,20	45,86



Ryc. 1. Wybrane profile elektroforetyczne DNaz w plazmie nasienia buhajów i knurów po inkubacji żeli w mieszaninie inkubacyjnej pH 5,0 i pH 7,4 (DNA-natywny)

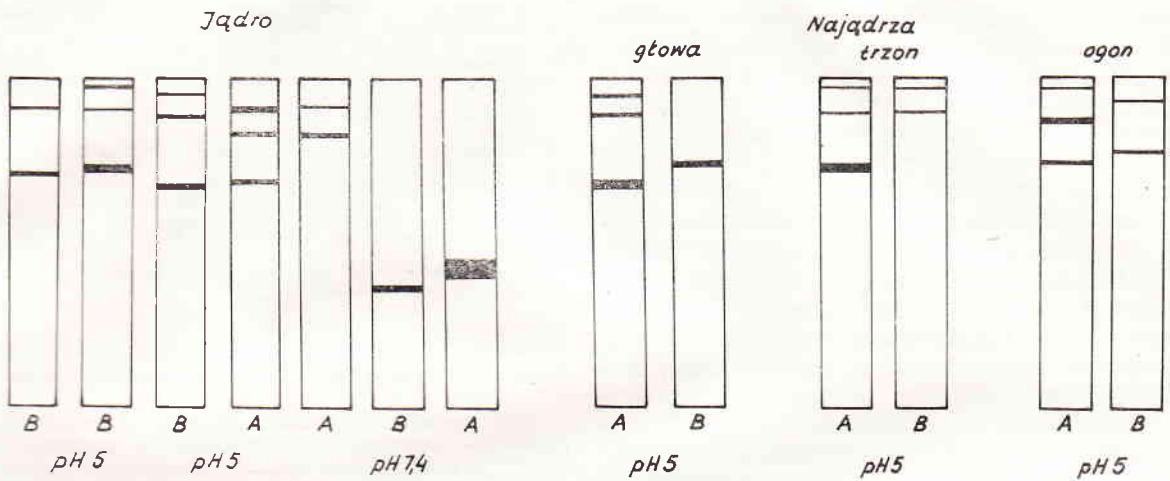
identyfikowano stosując mieszaninę zawierającą 0,15% gallocyjaninę i 5% siarczan potasowo-chromowy. Enzymogramy interpretowano przy użyciu densytometru LD-100 (firmy LKB).

Wyniki i omówienie

Tabela 1 przedstawia aktywność DNaz w wodnych homogenatach poszczególnych odcinków układu rozrodczego. Stwierdzono wysoką aktywność specyficzną DNaz w jądrach i najądrzach ze zdecydowaną jednak przewagą aktywności DNazy II. Szczególnie wysoką aktywnością obu enzymów charakteryzuje się płyn z ogona najądrzy knura. Aktywności omawianych enzymów potwierdzałyby intensywność przemian kwasów nukleinowych w tym odcinku układu rozrodczego. Dotyczyć one mogą mię-

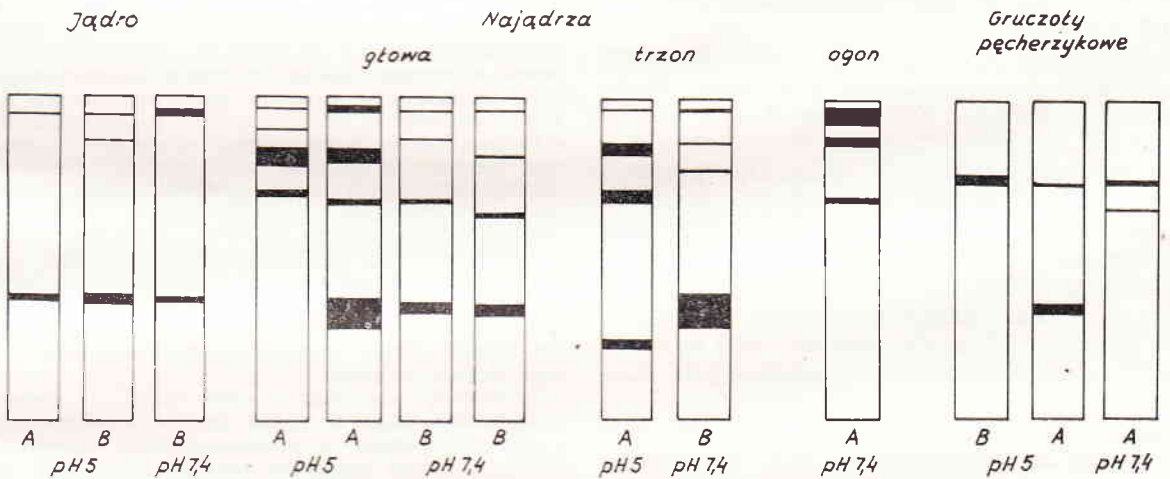
dzy innymi tworzenia kompleksów dezoksyrybonukleoproteinowych w procesie dojrzewania plemników (12).

W tab. 2 zestawiono aktywność DNaz zasadowej i kwaśnej w ekstraktach plemnikowych oraz plazmie nasienia buhajów w różnym wieku oraz knurów rozplodowych. Zaobserwowano przewagę aktywności DNazy kwaśnej nad zasadową oraz różnice gatunkowe w aktywności obu wymienionych enzymów. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi przez Quinna (11). Zdecydowanie najwyższą aktywność DNazy kwaśnej zaobserwowano w plazmie nasienia buhajków w wieku 14-miesięcy, natomiast poziom aktywności DNazy zasadowej był wyrównany, niezależnie od gatunkowego pochodzenia plazmy.



Ryc. 2. Przykłady różnych profili elektroforetycznych DNaz w wodnych homogenatach odcinków układu rozrodczego buhaja po inkubacji żeli w mieszaninie inkubacyjnej pH 5,0 i pH 7,4

Objaśnienia: A — DNA natywny, B — DNA zdenaturowany.



Ryc. 3. Przykłady różnych profili elektroforetycznych DNaz w wodnych homogenatach odcinków układu rozrodczego knura po inkubacji żeli w mieszaninie inkubacyjnej pH 5,0 i pH 7,4

Objaśnienia: A — DNA natywny, B — DNA zdenaturowany.

W plazmie nasienia knurów zaobserwowano osobniczo uwarunkowaną zmienność w zakresie omawianych aktywności DNaz. Przeprowadzone oznaczenia aktywności DNaz w ekstraktach plemnikowych knura i buhaja uzyskanych po traktowaniu komórek Tritonem X-100, wykazały zdecydowanie niższą aktywność wymienionych enzymów w porównaniu do plazmy nasiennej. Wskazywać to może, że głównym źródłem DNaz w nasieniu zwierząt są wydzieliny gruczołów dodatkowych.

Obok identyfikacji aktywności tkankowej DNaz celem badań było określenie stopnia heterogenności omawianych enzymów. Badania wstępne przeprowadzone na czystym preparacie DNazy I z trzustki bydłowej wykazały homogenne pasmo aktywności enzymu, niezależnie od pH mieszaniny inkubacyjnej. Stwierdzono również, że jakość substratu wpływa stymulu-

jąco na aktywność enzymu, co przejawia się wyraźniejszymi pasmami elektroforetycznymi po przeprowadzeniu reakcji identyfikującej. W przypadku zastosowania DNA zdenaturowanego otrzymuje się zwykle obraz pasm mniej aktywnych (ryc. 1).

W plazmie nasienia buhaja, niezależnie od pH mieszaniny inkubacyjnej, zaobserwowano od 2—4 form molekularnych DNaz. Częstość występowania 2 form enzymatycznych, o różnej ruchliwości elektroforetycznej była bardziej powszechna (ryc. 1). Występowanie zmiennej liczby form molekularnych DNaz w poszczególnych ejakulatach buhaja uwarunkowane może być przypuszczalnie różnym ich składem chemicznym, spowodowanym zakłóceniami proporcji udziału wydzielin gruczołów dodatkowych w ejakulacie. W przypadku plazmy nasienia buhajów młodych zaobserwowano 1

formę molekularną DNaz o podobnej ruchliwości elektroforetycznej w różnych przedziałach pH (ryc. 1). Stwierdzona różnica co do liczby form molekularnych DNaz w plazmie nasienia buhajów rozplodowych i młodych buhajków może wiązać się z niedojrzałością układu rozrodczego osobników młodych i nasilonymi procesami degradacyjnymi komórek płciowych.

W plazmie nasienia knura zidentyfikowano 3 formy molekularne DNaz (ryc. 1). Pasma DNaz w plazmie nasienia knura i buhaja różnią się zdecydowanie ruchliwością elektroforetyczną. Zjawisko to przypuszczalnie spowodowane może być różnym udziałem w cząsteczkach enzymów składników węglowodanowych (9). Przedstawione rezultaty badań profilów elektroforetycznych DNaz w plazmie nasienia buhaja i knura wskazują jednoznacznie na heterogenność obu typów enzymów. Przypuszczalnie wskutek słabego odzysku aktywności enzymów nie udało się natomiast zidentyfikować form molekularnych DNaz w ekstraktach plemnikowych knura i buhaja.

Obserwowano również profile elektroforetyczne DNaz w poszczególnych odcinkach układu rozrodczego buhaja i knura (ryc. 2, ryc. 3). Podobnie jak w plazmie nasienia stwierdzono mozaikę form molekularnych DNaz. Interpretacja uzyskanych rezultatów jest jednak trudna ze względu na dobrą rozpuszczalność enzymów nukleolitycznych w wodzie. Należy wobec powyższego przypuszczać, że uzyskany obraz profilów elektroforetycznych dotyczy nie tylko specyficznych DNaz, ale również całej puli enzymów nukleolitycznych wymienionych tkanek.

Tym niemniej obserwowane różnice gatunkowe w profilach tkankowych DNaz wskazywać mogą na różnorodności funkcji biochemicznych poszczególnych narządów u buhaja i knura. W przypadku knura zwraca uwagę szeroka mozaika form molekularnych omawianych enzymów w głowie i trzonie najądrzy w porównaniu do odpowiednich tkanek buhaja. Natomiast tkanka jądrowa obu rozplodników charakteryzuje się występowaniem podobnej liczby form molekularnych obu nukleaz.

Heterogenność elektroforetyczna białek nukleazowych w tkankach najądrzowych potwierdzałaby funkcję tego odcinka układu rozrodczego w procesie dojrzewania materiału genetycznego plemników oraz degradacji DNA, uwolnionego z rozpadających się komórek. W przypadku najądrzy knura wymienione procesy wydają się być bardziej nasilone. Zastosowanie metody mikroelektroforezy w żelu poliakrylamidowym do obserwacji heterogenności DNaz może być przydatne w badaniach stanu fizjologicznego tego narządu.

Piśmiennictwo

1. Cordonnier C., Bernardi G.: *Can. J. Biochem.* 46, 989, 1968.
2. Georgiev G. H., Zöllner E. J., Zahn R. K.: *Z. Naturf.* 31c, 826, 1976.

3. Hanada A., Nagase H.: *Jap. J. Anim. Reprod.* 16, 88, 1971.
4. Kornberg A. F.: *Enzymatic synthesis of DNA*. Ciba Lectures, J. Wiley and Sons, NY, 1961.
5. Kurnick W. B.: *Glick Methods* 9, 1, 1962.
6. Lachner H., Zöllner E. J., Zahn R. K.: *Z. Naturf.* 28c, 742, 1973.
7. Lachner H., Zöllner E. J., Zahn R. K.: *Andrologia* 6, 255, 1974.
8. Laskowski M.: *Deoxyribonucleases w: The Enzymes*, t. 5. Acad. Press, NY, 1961.
9. Neuhoff V.: *Arzneimittelforsch.* 18, 35, 1968.
10. Quinn P. J.: *J. Reprod. Fert.* 17, 35, 1968.
11. Strzeżek J., Smigielska J.: *Medycyna Wet.* 34, 617, 1978.
12. Weichselbaum T. E.: *Am. J. Clin. Path.* 10, 40, 1946.

Adres autora: prof. dr hab. Jerzy Strzeżek, ul. Kalinigradzka 41 m. 90, 10-437 Olsztyn

Чечот Г., Стшежек Е. — Гетерогенность деоксирибонуклеаз генеративной системы быка у хряка

При применении метода Дарник определили активность щелочной (I) и кислой (II) деоксирибонуклеаз в гомогенатах тканей генеративной системы, жидкости хвоста прадатков семенника и альвеолярных желез, плазме семени и живчиках быка и хряка.

Наивысшие активности обоих энзимов отметили в семеннике и придатках семеннике (особенно в голове и хвосте). Активность II деоксирибонуклеазы была решительно выше активности I. Наряду с видовыми различиями показали влияние возраста производителей на активность анализируемых энзимов в плазме семени. Методом микроэлектрофореза в полиакриламидном геле определили электрофоретическую гетерогенность деоксирибонуклеаз в плазме семени и гомогенатах участков генеративной системы обоих самцов. В плазме семени быка независимо от pH инкубационной смеси отметили 2—4 молекулярные формы деоксирибонуклеаз, причем частота появления 2 форм разной электрофоретической подвижности была более распространенной. В случае плазмы молодых быков наблюдали I молекулярную форму деоксирибонуклеаз подобной подвижности в разных пределах pH. В плазме семени хряка идентифицировали 3 молекулярные формы энзимов.

В случае гомогенатов семенников и придатков семенников быка и хряка отметили многие молекулярные формы деоксирибонуклеаз, причем особенно высокую дифференциацию этих форм показали в голове и теле придатков семенника хряка.

Czczot H., Strzeżek J. — Heterogenicity of deoxyribonucleases of the reproductive tract of bulls and boars

The activity of alkaline (I) and acid (II) DNase in homogenates of tissues of the reproductive tract, liquid of the tail of epididymis, vesicular glands, semen plasma and spermatozoa of bulls and boars was examined by the method of Kurnick. The highest activity of these two enzymes was found in testes and epididymis (especially in head and tail). The activity of DNase II exceeded significantly that of DNase I. Besides interspecies differences, age of animals influenced the activity of the analyzed enzymes in semen plasma. Using microelectrophoresis on polyacrylamide gel electrophoretic heterogenicity of DNases in plasma serum and in homogenates of the reproductive tract of the examined males was revealed. In semen plasma of bulls, irrespectively of pH of an incubation mixture, 2—4 molecular forms of DNases were found and two forms of various electrophoretic mobilities appeared more commonly. In serum plasma of young bulls one form of DNase; of a similar mobility in various ranges of pH was noted. In semen plasma of boars three molecular forms of DNases were identified. In testes and epididymis both of bulls and boars multiple forms of DNases were found, and especially high heterogenicity of these molecular forms was observed in the head and in the corpus of epididymis.