

ZDZISŁAW BORYCZKO, RICARDO FAUNDEZ

Metabolizm oraz aktywność aminotransferazy asparaginianowej podczas kapacytacji *in vitro* plemników buhajów

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR,
ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Kapacytacja plemników według Austina (2) i Chang'a (6) określana jest jako zespół zmian zachodzących w plemnikach w trakcie ich wędrówki przez drogi rodne żeńskie, umożliwiającym im zapłodnienie komórki jajowej.

Wśród różnych zmian związanych z kapacytacją plemnika zmiany w składzie błony plazmatycznej oraz w strukturze cząsteczkowej błony akrosomalnej, wzrost ruchliwości i zwiększone zużycie źródeł energetycznych oraz tlenu są najbardziej znaczące w tym procesie.

Zwiększone zużycie tlenu zaobserwowane zostało podczas inkubacji nasienia *in vitro* w obecności wydzielin jajowodów, macicy oraz płynu pęcherzyków jajnikowych, które indukują kapacytację (4, 9, 10, 12). Badania te nie wyjaśniły jednak w sposób jednoznaczny, dla czego kontakt z wydzielinami dróg rodnych wpływa na zwiększenie zużycia tlenu przez plemniki. Poza tym nadal mało wiadomo o metabolizmie kapacytowanego plemnika buhaja.

Oceny efektywności różnych metod kapacytacji nasienia buhaja jako fazy przygotowawczej do zapłodnienia *in vitro* dokonał Fukui i wsp. (11). Z pracy tej wynika, że płyn pęcherzykowy skutecznie indukuje kapacytację. Innym składnikiem stosowanym jako dodatek do mediów używanych do kapacytacji jest albumina (3).

W obserwacjach własnych, które przeprowadzono postanowiono określić wpływ płynu pęcherzykowego i albuminy surowicy bydłowej na zużycie tlenu oraz ruchliwość plemników. Poza tym oznaczano aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) w supernatantach uzyskanych z zawiesin plemników inkubowanych z różnymi stężeniami albuminy i płynu pęcherzykowego.

Materiał i metody

Nasienie pobierano przy pomocy sztucznej pochwy od 3 buhajów rasy ncb utrzymanych dla celów doświadczalnych. Użyto kilkunastu ejakulatów od każdego buhaja, a układ doświadczalny powtarzano od 5 do 15 razy. Do nasienia dodawano płyn pęcherzykowy, pobrany z pęcherzyków jajnikowych bydłych lub albuminę (frakcja V, firmy Sigma). Jajniki uzyskiwano w 20 min. po uboju z narządów rodnych nie wykazujących zmian patologicznych lub ciąży. Pęcherzyki jajnikowe sklasyfikowano według klucza Krui-pa i wsp. (13). Płyn poszczególnych pęcherzyków pozyskiwano przy pomocy strzykawek, a następnie odwirowano go przy 3000 obr./min. przez 10 min. w temperaturze 4°C. Do badań użyto płynu z pęcherzyków przedwulacyjnych. Płyn i albuminę sprowadzono do żądanych stężeń rozrzedzając je PBS. Zużycie tlenu

mierzono co 15 min. przez okres 1 godziny przy pomocy aparatu Warburga według ogólnie przyjętych zasad. Ruch postępowy plemników oraz aktywności AspAT badano w rozcieńczonym nasieniu inkubowanym przez 6 godz. przy temperaturze 37°C pobierając co 2 godziny próbkę z inkubatorów. W celu oznaczenia aktywności AspAT pobrano próbki z supernatantów uzyskanych po wirowaniu (3000 g) zawiesin plemników. Aktywność enzymu oznaczano używając zestawu AST-ALT firmy Lachema. Aktywność enzymatyczną podano w uU/ml osocza nasienia po odjęciu aktywności własnej płynu pęcherzykowego. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej porównując istotność różnic testem t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Płyn pęcherzykowy wzmagał w znacznym stopniu zużycie tlenu przez plemniki prawie natychmiast po jego dodawaniu do zawiesin (tab. 1). Najwyższą wartość zużycia tlenu w porównaniu do kontroli uzyskano w próbach zawierających 80% płynu pęcherzykowego 45 min. po rozpoczęciu inkubacji (30, 63 ul/10⁸ komórek przy 16,18 ul w kontroli). Podwyższone zużycie tlenu obserwowano we wszystkich próbowanych stężeniach płynu pęcherzykowego po 15, 30 i 45 minutach inkubacji. Po 60 minutach różnice te zmniejszyły się.

Koncentracje 2, 4, 6 mg/ml albuminy nie powodowały zwiększonego zużycia tlenu przez plemniki. W zawiesinach zawierających 10 mg/ml albuminy stwierdzono obniżenie oddychania plemników po 45 min. inkubacji.

Po 2 i 4 godz. inkubacji ruchliwość postępową plemników była istotnie wyższa w próbkach zawierających 10 mg/ml albuminy oraz 60 i 80% płynu pęcherzykowego (tab. 2). Po 6 godz. inkubacji nie stwierdzono różnic w ruchliwości plemników między próbkami zawierającymi albuminę i płyn pęcherzykowy a kontrolnymi.

Płyn pęcherzykowy powodował znaczny wzrost aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) we wszystkich badanych próbach nasienia (tab. 3). Nagły wzrost aktywności enzymatycznej w próbkach z udziałem płynu pęcherzykowego obserwowano natychmiast po dodaniu płynu pęcherzykowego do nasienia. Aktywność ta była trzy razy wyższa w próbkach zawierających 80% płynu pęcherzykowego: mianowicie 276,44 uU/ml w porównaniu z wartościami prób kontrolnych 91,62 uU/ml. Aktywność AspAT wzrastała w pierwszych dwóch godzinach inkubacji. Po tym czasie poziom tego enzymu ulegał stabilizacji. W przypadku albuminy stwierdzono wystąpienie istot-

Tab. 1. Zużycie tlenu przez plemniki buhaja inkubowane z albuminą i płynem pęcherzykowym w różnych stężeniach (x±s)

Stężenia albuminy i płynu pęcherzykowego	Zużycie tlenu w ul. O ₂ /10 ⁸ plemników				
	15 min	30 min	45 min	60 min	
Albumina 2mg/ml	7,19 ± 2,70	12,49 ± 3,80	18,69 ± 3,58	23,81 ± 7,31	
4mg/ml	5,33 ± 2,95	10,53 ± 4,74	16,23 ± 3,66	19,70 ± 4,80	
6mg/ml	5,59 ± 4,04	12,93 ± 4,15	16,45 ± 4,38	19,13 ± 5,77	
10mg/ml	5,49 ± 2,23	9,18 ± 3,30	11,39 ± 2,60*	14,96 ± 3,24**	
Płyn pęcherzykowy	20%	7,29 ± 2,44	19,74 ± 5,28**	24,38 ± 8,52*	29,55 ± 9,03
	40%	8,91 ± 3,17	18,15 ± 4,18**	24,88 ± 6,53**	31,14 ± 7,86**
	60%	10,67 ± 4,33	19,27 ± 8,47**	25,76 ± 10,40	31,96 ± 12,04
	80%	11,90 ± 4,82*	23,47 ± 7,67**	30,63 ± 9,02**	29,31 ± 12,88
Kontrola (PBS)	6,09 ± 2,93	12,18 ± 4,91	16,18 ± 6,23	21,82 ± 7,62	

Objaśnienia: x — istotność różnic przy p < 0,05, xx — p < 0,01.

Tab. 2. Procent plemników ruchliwych inkubowanych albuminą i płynem pęcherzykowym w różnych stężeniach (x±s)

Stężenia albuminy i płynu pęcherzykowego		Czas inkubacji (godz.)			
		0	2	4	6
Albumina 2mg/ml		75,0 ± 4,4	65,0 ± 15,4	52,5 ± 20,4	35,0 ± 12,6
4mg/ml		75,0 ± 4,4	60,0 ± 15,8	51,6 ± 13,6	29,0 ± 13,9
6mg/ml		74,1 ± 5,8	74,0 ± 18,1	50,8 ± 18,5	34,0 ± 12,0
10mg/ml		75,0 ± 4,4	76,0 ± 16,7*	60,0 ± 10,5**	42,0 ± 14,7
Płyn pęcherzykowy	20%	69,0 ± 5,4	62,0 ± 11,5	48,0 ± 11,67	26,0 ± 19,0
	40%	70,0 ± 6,1	61,0 ± 10,2	50,0 ± 17,3	22,0 ± 18,3
	60%	70,0 ± 4,2	63,3 ± 2,8*	63,3 ± 2,8**	35,0 ± 12,9
	80%	71,0 ± 2,8	70,0 ± 1,2**	65,0 ± 5,0**	33,3 ± 17,0
Kontrola (PBS)		72,0 ± 8,2	56,6 ± 14,5	40,6 ± 13,3	29,6 ± 11,0

Objaśnienia: x — istotność różnic przy p < 0,05, xx — p < 0,01.

Tab. 3. Aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) w supernatantach otrzymanych z zawiesiny plemników inkubowanych z albuminą i płynem pęcherzykowym w różnych stężeniach (x±s)

Stężenie albuminy i płynu pęcherzykowego		Czas inkubacji (godz.)			
		0	2	4	6
Albumina 2mg/ml		99,91 ± 51,87	113,28 ± 26,62	109,09 ± 31,96	106,76 ± 15,98
4mg/ml		94,34 ± 55,91	114,98 ± 24,98	111,35 ± 51,58	110,77 ± 19,66
6mg/ml		76,26 ± 40,03	91,01 ± 15,47**	108,20 ± 46,54	103,26 ± 17,74
10mg/ml		82,10 ± 56,98	104,87 ± 10,97**	96,02 ± 37,62	114,36 ± 29,38
Płyn pęcherzykowy	20%	156,82 ± 48,66	213,18 ± 34,63*	256,13 ± 58,94*	255,65 ± 82,15
	40%	195,27 ± 36,79**	280,45 ± 62,95**	270,66 ± 60,46*	270,58 ± 68,25*
	60%	234,83 ± 39,20**	294,0 ± 34,07**	318,27 ± 48,99**	317,45 ± 54,52**
	80%	276,44 ± 73,02**	314,12 ± 9,22**	320,05 ± 16,35**	329,12 ± 17,70**
Kontrola (PBS)		91,62 ± 40,62	114,34 ± 22,03	145,00 ± 42,01	147,28 ± 38,64

Objaśnienia: x — p < 0,05, xx — p < 0,01.

nie niższej aktywności AspAT po 2 godz. inkubacji w zawiesinach zawierających 6 i 10 mg/ml w porównaniu z kontrolą. Taką tendencję do zmniejszonego uwalniania AspAT do inkubatów wykazywały wszystkie atestowane koncentracje albuminy.

Otrzymane wyniki potwierdzają pobudzający wpływ płynu pęcherzykowego na metabolizm plemników podczas ich kapacytacji. Stwierdzono natomiast, że albumina nie ma większego wpływu na zużycie tlenu przez plemniki, a nawet w przeciwieństwie do płynu pęcherzykowego może obniżać ich oddychanie i jednocześnie skutecznie podtrzymywać ich ruchliwość. Brak wpływu albuminy na oddychanie plemników myszy zarejestrował Boell (5). Zwiększony metabolizm plemników inkubowanych w płynie kapacytującym prawdopodobnie zależy od obecności substratów ulegających utlenieniu. Dlatego też wydaje się, że zwiększone zużycie tlenu stanowi proces towarzyszący kapacytacji, a nie jest czynnikiem, który ją wywołuje. Płyn pęcherzykowy jest ważnym źródłem substratów energetycznych jak glukoza, pirogronian i mleczan (8). Substancje te i inne, jak hypotauryna, tauryna, epinefryna i albumina obecne w płynie pęcherzykowym wydają się mieć istotny wpływ na utrzymanie ruchliwości postępowej plemników (1, 14, 15).

Oznaczanie aktywności AspAT w odwirowanej plaźmie nasienia było proponowane jako próba pomocna w określeniu jakości nasienia buhaja (16). Z badań tych wynikało, że stopień uszkodzenia plemnika koreluje z aktywnością AspAT uwalnianej do osocza nasienia. Otrzymane wyniki wydają się wskazywać na fakt, że płyn pęcherzykowy może powodować głęboką zmianę w rejonie mitochondrialnym, która prowadzi do znacznego, szybkiego uwalniania enzymu AspAT. Jednak na podstawie badań własnych nie jest możliwe stwierdzenie, czy wysoki poziom aktywności enzymu w supernatantach z udziałem tego płynu jest wynikiem zwiększonej przepuszczalności błon plemników lub odbiciem innych procesów.

Piśmiennictwo

1. Alvares J. G., Storey B. T.: Biol. Reprod. 29, 548, 1985.
2. Austin C. R.: Nature 170, 326, 1952.
3. Bavister B. D.: w Fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, N.Y. 1981.
4. Black D. I., Crowley L. V., Duby R. T., Spilman C. H.: J. Reprod. Fert. 15, 127, 1968.
5. Böel E. J.: J. Exp. Zool. 234, 105, 1985.
6. Chang M. C.: Nature 168, 697, 1951.
7. Davis B. K., Byrne H. R., Hungund B.: Biochim. Biophys. Acta 257, 558, 1979.
8. Edwards R. G.: J. Reprod. Fert. 37, 189, 1974.
9. Faundes R., Fitko R., Liminowicz J.: Endokr. pol. 5, 413, 1977.
10. Foley C. W., Williams W. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 634, 1967.
11. Fukui J., Fukushima M., Ono H.: Theriogenology 20, 651, 1983.
12. Iritani A., Gomes W. R., Vandemark N. L.: Biol. Reprod. 1, 77, 1969.
13. Kruij P. A. M., Dieleman S. J.: Reprod. Nutr. Devl. 22, 465, 1982.
14. Leibfried M. L., Bavister B. D.: Gamet Res. 4, 57, 1981.
15. Leibfried M. L., Bavister B. D.: J. Reprod. Fert. 66, 97, 1982.
16. Pace M. M., Graham E. F.: Biol. Reprod. 3, 140, 1978.

Борычко З., Фаундес Р. — Метаболизм и активность глутаматаспартаттрансаминазы во время капацитации *in vitro* бычьих живчиков

Цель исследований состояла в определении влияния фолликулярной жидкости и альбумина сыворотки скота на расход кислорода и подвижность живчиков. Семя быка подвергали капацитации *in vitro*, применяя жидкости, содержащие разные концентрации альбумина либо фолликулярной жидкости скота. Во время инкубации определяли расход кислорода, подвижность живчиков и активность глутаматаспартаттрансаминазы. Фолликулярная жидкость в значительной степени усиливала расход кислорода живчиками после ее прибавления к суспензиям живчиков. Иной эффект можно было заметить в пробах, содержащих 10 мг/мл альбумина. Фолликулярная жидкость вызывала внезапный значительный рост активности AspAT, освобождаемой в плазму семени. В пробах семени с альбумином отметили тенденцию к уменьшенному освобождению AspAT в инкубаты. Как альбумин, так и фолликулярная жидкость, стимулировали в течение 4 часов инкубации, а даже дольше подвижность живчиков.

Boryczko Z., Foundez R. — Metabolism and activity of aspartic aminotransferase during capacitation *in vitro* of spermatozoons of the bull

The aim of the studies was to determine the effect of vesicular fluid and bovine serum albumine on oxygen consumption and mobility of spermatozoons. The sperma of a bull was submitted to capacitation *in vitro* in fluids containing albumine or vesicular fluid in various concentrations. Oxygen consumption, motility of spermatozoons and the activity of aspartic aminotransferase were determined during incubation. It was found that bovine vesicular fluid added into a suspension of spermatozoons increased to a great extent oxygen consumption. A distinct effect was noted when albumin at a concentration of 10.0 mg/ml was used. The vesicular fluid increased suddenly AspAT activity liberated to the plasma semen. In the samples of sperma with albumine added a tendency to decrease of liberation of AspAT to the incubates was observed. Both albumin and vesicular fluid stimulated after 4 hr or even longer time of incubation motility of spermatozoons.

CARROL A. G., CAMPBELL R. S. F.: Badania nad rozmnażaniem i występowaniem leptospir u bydła mięsnego w centralnej Queensland. (Reproductive and leptospiral studies on beef cattle in central Queensland). Aust. vet. J. 64, 1—5, 1987 (1)

Przebadano wpływ pory deszczowej na rozmnażanie oraz wpływ pory deszczowej i typu gleb na występowanie leptospir u bydła mięsnego w centralnej Queensland (Australia). Spadek poziomu opadów pociągał za sobą statystycznie znamienne obniżenie odsetku wycieleń. Badania serologiczne wykazały natomiast, że procent sztuk reagujących dodatnio na antygen L serovar. hardjo jest wyższy w porze deszczowej na fermach o glebach dobrze nawilgoconych. Typ gleb nie wpływa natomiast w sposób wyraźny na odsetek wycieleń. Maksymalne nasilenie zakażeń wywołanych przez Leptospira serovar. hardjo przypada na ostatni trymestr ciąży.

G.