

AKTYWNOŚĆ RYBONUKLEAZY W EJAKULATACH KNURÓW*

Andrzej Dubiel, Jacek Króliński, Maria Malicka

Klinika Położnicza Instytutu Patologii i Terapii Zwierząt
Akademii Rolniczej we Wrocławiu

Przechowywanie nasienia knura przez okres 2-3 dni w rozrzedzalnikach glukozowo-cytrynianowo-zóltkowym lub glukozowo-dwuwęglanowo-zóltkowym prowadzi do odłączenia się akrosomu i utraty DNA zawartego w plemnikach [8-10]. W celu zapobieżenia tego rodzaju następstwom w wyniku długotrwałego przechowywania nasienia Pliszko [8] wprowadził do rozrzedzalnika glukozowo-cytrynianowego dodatek soli sodowej kwasu etyleno-tetra-octowego, używanego w wielu krajach pod różnymi nazwami [4]. Substancja ta ma wiązać jony metali, a szczególnie wapnia i magnezu, hamując aktywność różnych enzymów proteo- i nukleolitycznych, do których należy rybonukleaza.

Aktywność wymienionego enzymu w nasieniu buhajów została dokładnie opracowana [2, 3, 5-7]. Natomiast w dostępnej literaturze światowej brak jest danych dotyczących aktywności rybonukleazy w nasieniu knura, co skłoniło autorów do przeprowadzenia badań w tym zakresie.

* Praca wykonana w ramach problemu MR II 10 koordynowanego przez Instytut Patologii i Terapii Zwierząt Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na ejakulatach 6 knurów rasy wielkiej białej ostrouchej, w wieku 1-2 lat, o wadze 150-350 kg. Ejakulaty pobierano 1-2 razy tygodniowo, a następnie przeprowadzono ocenę nasienia polegającą na określeniu jego objętości, barwy, konsystencji, pH, odsetka plemników o ruchu prawidłowym, morfologii i koncentracji plemników. Materiał do badań biochemicznych uzyskiwano po odwirowaniu świeżych próbek ejakulatu. Odwirowane osocze nasienia ampułkowano i natychmiast zamrażano w temperaturze 253 K. Plemniki przepłukiwano płynem fizjologicznym i konserwowano podobnie jak osocze nasienia. W 1-5 dni po zamrożeniu, próbki rozmrażano i oznaczano w nich aktywność rybonukleazy za pomocą zmodyfikowanego testu Anfinsena [1] przy pH 7,6 w 0,05M buforze tris-HCl. Warunki reakcji: substrat RNA drożdżowy 0,8% dializowany do H₂O, czas reakcji 10 minut, temperatura 310 K.

Za jednostkę RN-azową przyjęto taką aktywność, która w warunkach testu powoduje przyrost ekstynkcji o 0,1

$$\left(\Delta E \frac{1 \text{ cm}}{260 \text{ m}\mu} = 0,1 \right).$$

Po oznaczeniach wstępnych, zwierzęta (6 sztuk) poddano zabiegowi przecięcia i podwiązania nasieniowodów, wyłączając wydzielinę jąder i najądrzy z ejakulatów. Pojawienie się azoospermii świadczyło o prawidłowo przeprowadzonej operacji.

Przed zabiegiem i 14 dni po zabiegu operacyjnym od każdego samca pobierano i przebadano po 5 ejakulatów w odstępach 3-7 dni. Otrzymane wyniki ujęto statystycznie, określając istotność

różnic między średnimi, dotyczącymi aktywności rybonukleazy przed i po zabiegach operacyjnych na układzie płciowym, przy pomocy testu t Studenta na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI BADAŃ I OMÓWIENIE

Aktywność badanego enzymu przed zabiegiem operacyjnym kształtowała się w granicach od 10,0 do 20,0 jednostek w 1 ml plazmy, średnio 13,42. Wykazano również, że aktywność rybonukleazowa plemników knura w 1 ml nasienia waha się w granicach 1,0-4,6 jednostek, średnio 2,9 i rośnie wraz z koncentracją plemników w ejakulacie.

	wahania	średnio
plazma nasienia przed zabiegiem operacyjnym	10,0-20,0	13,42 \pm 2,87
po wyłączeniu wydzieliny jąder i najądrzy	4,0-18,0	10,06 \pm 4,47

Średnia aktywność RN-azowa 1 mld plemników knura wynosi 5,43 jednostek z wahaniami 2,8-9,0. Zaznaczyły się istotne różnice w poziomie aktywności enzymu u poszczególnych knurów. Różnice te występowały nie tylko pomiędzy ejakulatami różnych osobników, ale także między ejakulatami tego samego zwierzęcia pobranymi w odstępach 3-7 dni.

Zanotowano wyraźną zmianę aktywności rybonukleazy w ejakulatach 6 knurów po wyłączeniu wydzieliny jąder i najądrzy. Poziom rybonukleazy po przecięciu i podwiązaniu nasieniowodów tuż przy ogonach najądrzy wyraźnie obniżył się, średnio

10 jednostek/ml. Stwierdzono istotne różnice statystyczne między średnimi. Nasuwa się przeto wniosek, że aktywność RN-azowa nasienia knurów jest związana zarówno z osoczem jak i z plemnikami.

Już w latach sześćdziesiątych Matousek [6] udowodnił, że podskórna lub dojądrowa iniekcja wydzieliny gruczołów pęcherzykowych buhaja powoduje uszkodzenie nabłonka nasieniotwórczego u myszy, szczurów, świnek morskich, królików i tryków. Obserwowano także ujemny wpływ wydzieliny tych gruczołów na płodność samic myszy i kur [7]. Matousek i Dostal [3] wyosobnili z wydzieliny gruczołów pęcherzykowych buhaja czyste białko o podobnych właściwościach antyspermatogennych. Białko to charakteryzowało się ciężarem cząsteczkowym w granicach 22 000-44 000, a jego czystość udowodniono na podstawie badań chromatograficznych, elektroforezy na żelu skrobiowym i immunoelektroforetycznych. Wykazano także znaczne podobieństwo pomiędzy fizykochemicznymi właściwościami antyspermatogennych białek Dostala i Matouska a rybonukleazą (RNA-aza BS1). Enzym ten został odkryty w plazmie nasienia buhaja i następnie otrzymany w formie krystalicznej [2], przy czym jest on identyczny z antyspermatogenną substancją opisaną przez Matouska [3].

Obserwacje własne wykazały, że aktywność rybonukleazowa nasienia knura związana jest nie tylko z osoczem, ale także z plemnikami, co może mieć duże znaczenie praktyczne w dalszych badaniach nad konserwacją nasienia knura w różnych temperaturach.

WNIOSKI

Aktywność rybonukleazowa nasienia knurów związana jest z plazmą (średnio 13,42 jednostek w 1 ml) i z plemnikami (średnio 2,9 jednostek w 1 ml). Poziom aktywności rybonukleazy w nasieniu knura rośnie wraz z koncentracją plemników.

Wyłączenie wydzieliny jąder i najądrzy z nasienia na drodze operacyjnej powoduje wyraźne obniżenie się aktywności rybonukleazy.

PIŚMIENNICTWO

1. Anfinsen Ch.B., Redfield R.R., Choate W.L., Page J., Carrol W.: Studies on the gross structure, cross linkages and terminal sequences in ribonuclease. J. Biol. Chem., 207, 201, 1954.
2. D'Alesio G., Leone E.: The action of seminal enzymes on ribonucleic acid. Biochem. J. 89, 7, 1963.
3. Dostal J., Matousek J.: Purification of aspermatogenic substance in bull seminal vesicle fluid. J. Reprod. Fert. 31, 273, 1972.
4. Kareta W., Wierzchoś E., Pilch J.: Metody konserwacji nasienia tryków, knurów i ogierów. Warszawa 1969, 32.
5. Leone E., Greco L., Rastogi R.K., Iela L.: Antispermatogenic properties of bull seminal ribonuclease. J. Reprod. Fert. 34, 197, 1973.
6. Matousek J.: Effects on spermatogenesis in guinea-pigs, rabbits and sheep after their immunization with sexual organ fluids of bull. J. Reprod. Fert. 19, 63, 1969.
7. Matousek J., Petrovska E.: Antifertilizing effect of the seminal vesicle fluid of bulls on females. J. Reprod. Fert. 20, 189, 1969.
8. Pliszko N.T.: Sposob prodlienija žizni i oplodotvorja jusz-

- czej sposobnosti połowych kłietok hriaka. Svinovodstvo 19, 37, 1965.
9. Sadovnikova M.T.: Hranieniye siemieni hriakov biez hlado-agentov. Svinovodstvo 20, 28, 1966.
10. Sierdiuk S.I., Bielikov A.A.: Osiemienieniye sviniej transportirovannoj spiermoj. Svinovodstvo 21, 28, 1967.

A. Dubiel, J. Króliński, M. Malicka

THE RIBONUCLEASE ACTIVITY OF BOAR EJACULATES

S u m m a r y

Investigations have been carried out using 6 A.I. boars of the Polish Landrace, 1-2 years of age and 150-350 kg of live weight. The semen was collected 1-2 times weekly and examined by routine methods. After preliminary observations the animals were vasectomized. The ribonuclease activity before and after operation was determined by the modified Anfinsen test. The mean ribonuclease activity of seminal plasma was 13.4 U/ml (10.0-20.0), that of spermatozoa 2.9 U/ml (1.0-4.6) and was correlated with sperm concentration. Following vasectomy in close vicinity to cauda epididymis the ribonuclease activity decreased to 10.0 U/ml which suggests that the ribonuclease activity in boar semen derives not only from seminal plasma but also from spermatozoa.

А.Дубель, Я.Крулиньски, М.Малицка

Активность рибонуклеазы в эякулятах хряков

Резюме

Опыты проводились на эякулятах 6 хряков крупной белой острой породы в возрасте 1-2 года и весе 150-300 кг. Семя брали 1-2 раза в неделю и проводили опытные вступительные исследования.

По вступительном наблюдении животных подвергнуто вазектомии. Рибонуклеазная активность до и после операции определялась при помощи модифицированного теста Анфинсена. Средняя активность рибонуклеазная в плазме семени составляла 13,4 ед/мл (10-20), а живчиков - 2,9 ед/мл (1-4,6) и коррелировала с концентрацией живчиков. После вазектомии вблизи хвоста придатка активность рибонуклеазная снижалась к 10 ед/мл; это указывает что рибонуклеазная активность у хряков возникает не только из плазмы семени, но также из живчиков.