

BADANIE PLAZMY FRAKCJONOWANEGO NASIENIA
ORAZ WYDZIELINY
SKŁADOWYCH NARZĄDU ROZRODCZEGO OGIERA

*Henryk Balbierz, Władysław Bielański,
Kazimierz Kosiniak, Maria Nikołajczuk*

Zakład Immunopatologii i Immunogenetyki
Instytut Patologii i Terapii Zwierząt, Wydział Weterynaryjny AR we Wrocławiu
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Henryk Balbierz
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Ryszard Badura
Instytut Stosowanej Fizjologii Zwierząt, Wydział Zootechniczny AR w Krakowie
Dyrektor: prof. dr hab. Władysław Bielański

W badaniach nad plazmą nasienia człowieka Leithoff i wsp. [5] opisali 11 frakcji białkowych, z których cztery przypisano najądrzu, pięć gruczołowi pęcherzykowemu, dwie prostatie i dwie gruczołowi Cowpera.

W roku 1963 Herrmann i Shirren [cyt. za 7] opisali 9 składowych, z których jedna była związana ze składową surowicy krwi. W dalszych doniesieniach opisano 8 składowych, a wśród nich: dwie kwaśne fosfatazy, dwie aminopeptydazy, proteazę, laktoferynę oraz dwie składowe o przedziale sedimentacji 1,1S i 3,7S.

Shulman i Tien Shun Li [7] opisują 12 składowych plazmy nasienia człowieka, wykrywalnych immunoelektroforetycznie, które dla ułatwienia interpretacji zebrano w grupy oznaczone literami od A do F.

Herrmann w roku 1973 podaje [3], że jedno z białek opłaszczających plemniki — laktoferyna, białko o ruchliwości *beta* pochodzi z pęcherzyków nasiennych, inne — o ruchliwości *alfa* okazało się kwaśną fosfatą, a jeszcze inne — także o ruchliwości *alfa* — było immunologicznie identyczne z pepsynogenem III soku żołądka. Podobne badania nad plazmą nasienia buhaja przeprowadzili Balbierz i wsp. [1].

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 09.3.1., koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

W zebranych dotychczas przez nas piśmiennictwie nie posiadamy opracowań dotyczących plazmy nasienia ogierów. W obecnym doniesieniu przedstawiamy wyniki badań nasienia ogiera, uzyskanego frakcjami oraz wydzielin z ogona najądrza, nasieniowodu, ampułki nasieniowodu, gruczołu pęcherzykowego i gruczołu krokowego, pobranych po uboju.

MATERIAŁ I METODY

Badano plazmę nasienia 4 ogierów, pobieranego kilkakrotnie do sztucznej pochwy model Kraków—72, pozwalającej na zebranie oddzielnie każdego wyrzutu nasienia w trakcie ejakulacji. Zawartość każdego wyrzutu wirowano odrębnie, celem uzyskania plazmy.

Wydzielinę z ogona najądrza, nasieniowodu, ampułki nasieniowodu, gruczołu pęcherzykowego i gruczołu krokowego pobrano od 2 ogierów — po ich uboju.

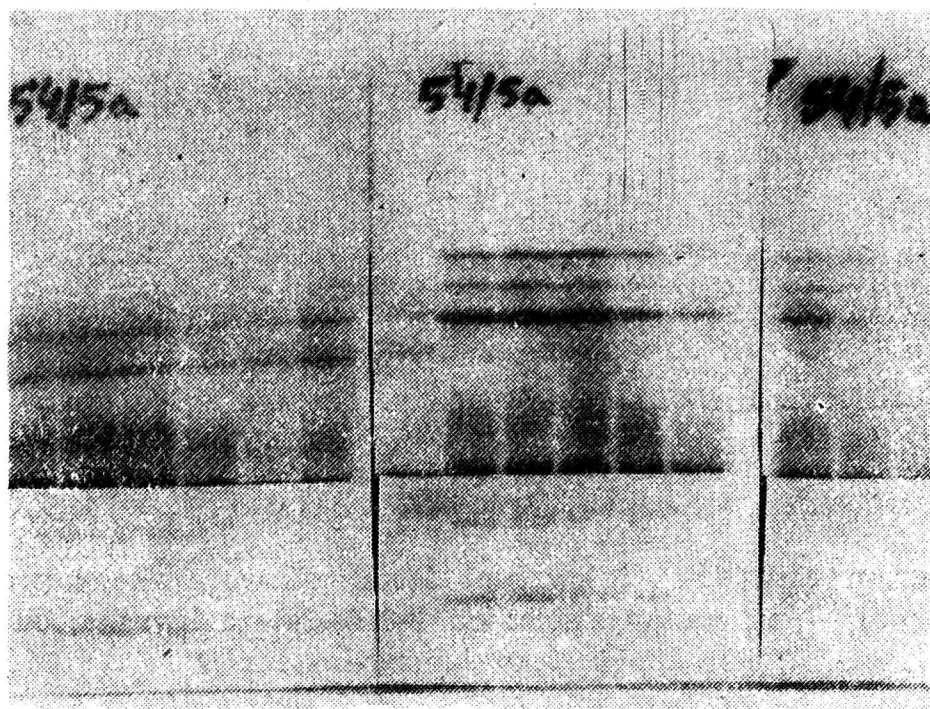
Uzyskany materiał badano, stosując metodę elektroforezy w żelu krochmalowym oraz immunoelektroforezę dla określenia proteinogramu i aktywności niektórych enzymów w warunkach opisanych w poprzednich doniesieniach [2, 6].

Ograniczona objętość wydzielin uzyskanych z poszczególnych odcinków narządu rozrodczego pozwoliła na przeprowadzenie wyłącznie badań immunoelektroforetycznych.

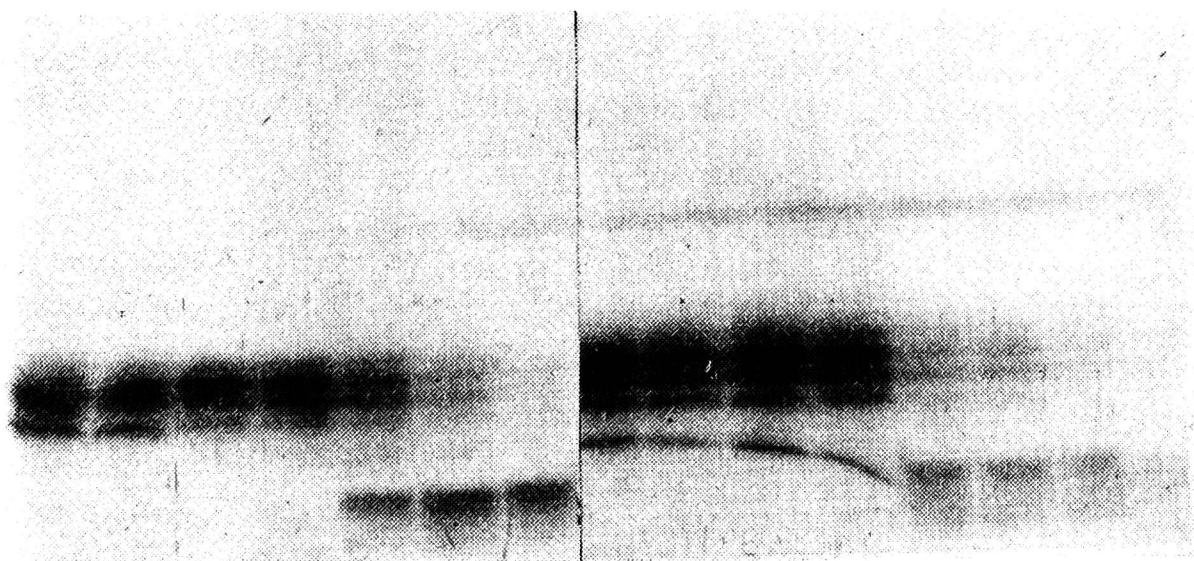
WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zdjęcie pierwsze przedstawia proteinogram w żelu krochmalowym, uzyskany z rozdziału plazmy kolejnych wyrzutów nasienia podczas jednej ejakulacji. Jak widać, po trzech pierwszych wyrzutach ilość białka w dalszych porcjach maleje. Obraz taki występował regularnie we wszystkich pobraniach, z tym że wyraźne osłabienie frakcji pojawiało się niekiedy nieco później — w czwartym lub piątym wyrzucie nasienia.

Fotogram 2 jest obrazem zymogramów frakcji, wykazujących aktywność esteraz. Esterazy karboksylowe wykazują w strefie I aktywność we wszystkich porcjach frakcjonowanego nasienia, jednakże, z reguły, od porcji piątej aktywność ta stopniowo słabnie. Stopień tego osłabienia jest różny i wydaje się zmieniać u różnych ogierów, a być może także w różnych pobraniach. Wraz z zaznaczonym osłabieniem aktywności strefy I pojawiać się może czołowa, pojedyncza wstęga aktywności, a jednocześnie pojawiają się pasma aktywności także w strefie II (rys. 2). Wstęgi aktywności w strefie III — o ile występują — są obecne w pierwszych porcjach nasienia i znikają w dalszych. Fosfataza zasadowa — obecna



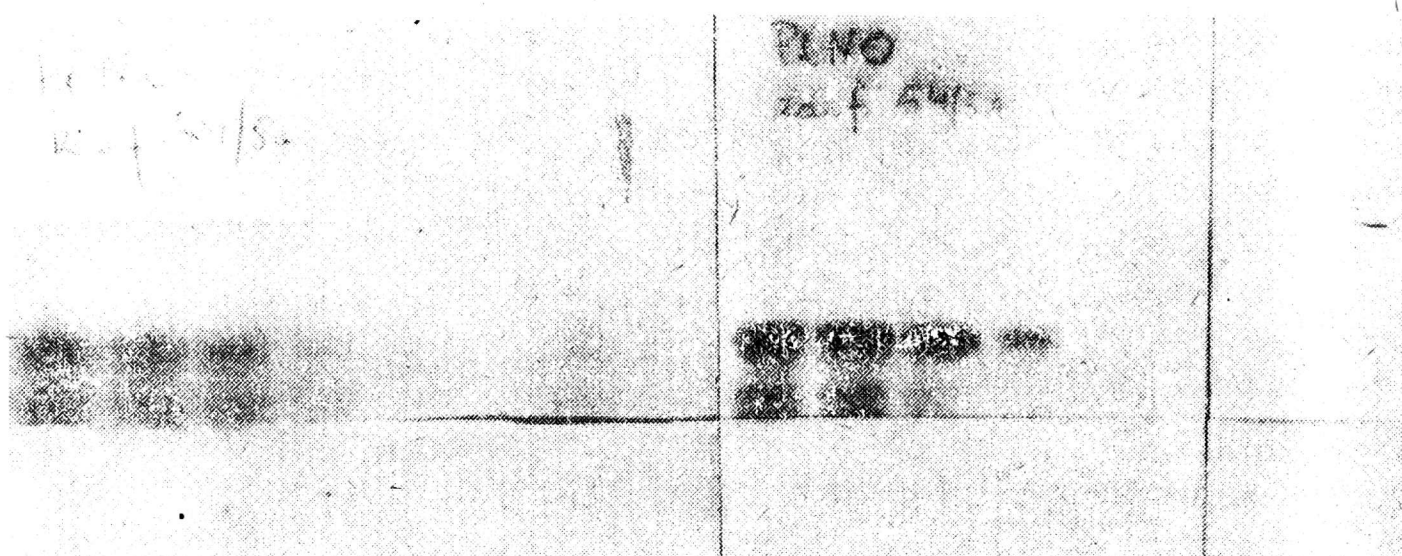
Rys. 1. Proteinogram w żelu krochmalowym frakcjonowanego nasienia dwóch ogierów. Od lewej — na stanowiskach: od 1-7 ogier C, od 8-15 ogier B



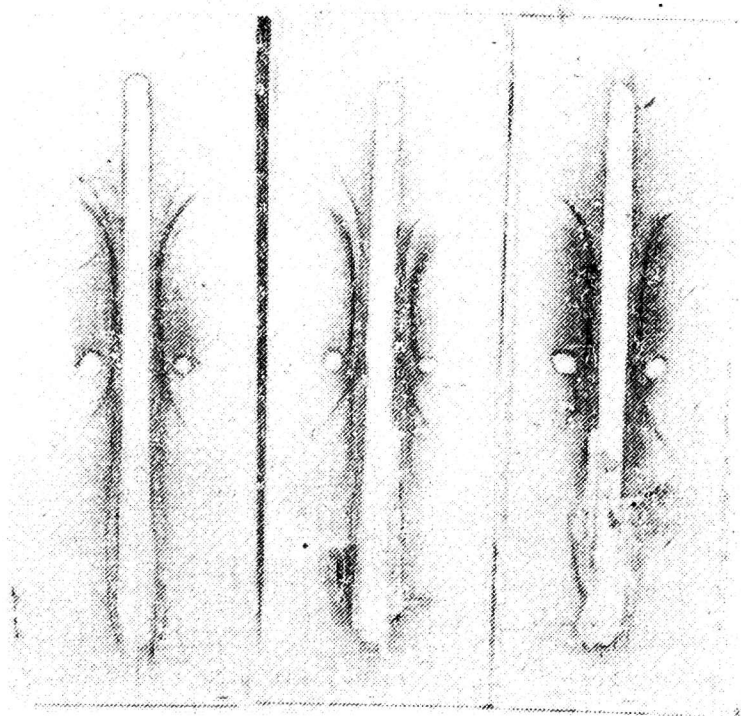
Rys. 2. Zymogram aktywności esteraz karboksylowych we frakcjonowanym nasieniu ogierów. Od lewej — na stanowiskach: od 1-7 ogier C, od 8-15 ogier A

w strefie II występuje w porcjach pierwszych, znikając stopniowo w piątej lub szóstej (rys. 3a). Fosfataza kwaśna — zajmująca tę samą strefę — daje podobny obraz jak fosfataza zasadowa i wykazuje również identyczną dynamikę znikania w kolejnych porcjach nasienia (rys. 3b).

Immunoelktroforegram frakcjonowanego nasienia ujawnia, podobnie jak to unaoczniły wyniki elektroforezy w żelu krochmalowym, zmiany stężeń, a niekiedy brak poszczególnych frakcji białka w kolejnych porcjach nasienia (rys. 4).



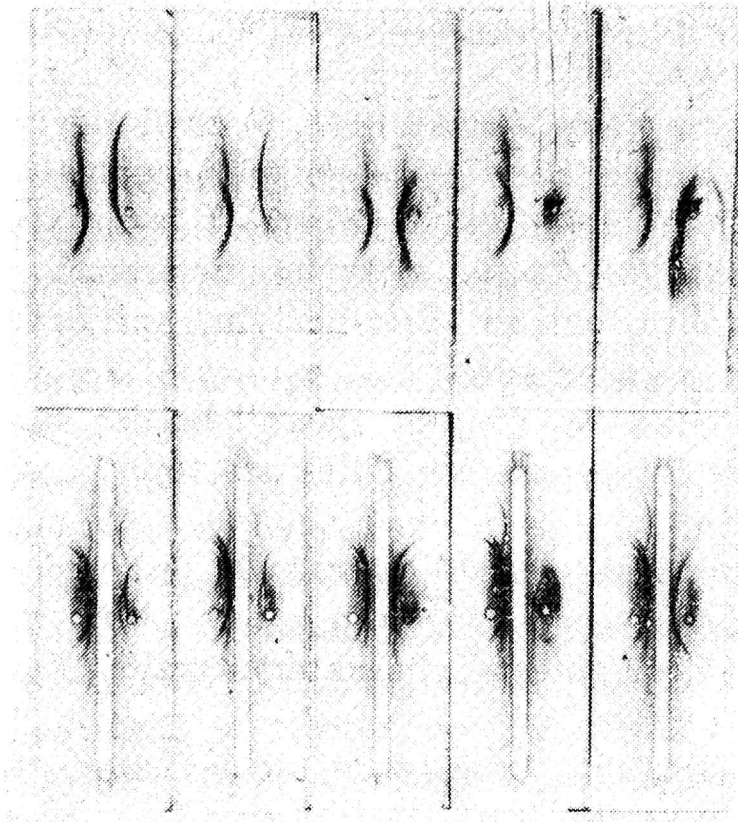
Rys. 3. Zymogram zasadowej i kwaśnej fosfatazy we frakcjonowanym nasieniu ogierów. Od lewej — na stanowiskach: od 1-8 fosfataza kwaśna, od 9-16 fosfataza zasadowa tego samego ogiera B



Rys. 4. Immuno-elektroforegram białek plazmy frakcjonowanego nasienia. W dołkach startowych od lewej porcje nasienia: pierwsza i druga oraz piąta i szósta ogiera D; preparat trzeci — porcja pierwsza i siódma ogiera C

W immuno-elektroforegramach wydzielin, pobranych po uboju z poszczególnych odcinków narządu rozrodczego, różnice w ilości i umiejscowieniu frakcji białkowych wydają się charakterystyczne dla odcinków, z których pochodzą (rys. 5).

Ogon najądrza (rys. 5) ujawnia dwie lub trzy linie precypitacyjne, wybarwiające się z czerwienią pasową. Jedna z nich leży w rejo-



Rys. 5. Immunoelktroforegramy wydzielin składowych narządu rozrodczego ogiera. Na preparatach od lewej wydzielina: ogona najądrza, nasieniowodu, ampułki nasieniowodu, gruczołu pęcherzykowego, gruczołu krokowego. Rząd górny — esterazy karboksylowe, rząd dolny — frakcje białek. Na wszystkich preparatach w dołkach startowych po stronie lewej (dla porównania) rozdzielona pełna plazma nasienia ogiera

nie A na wysokości albumin, jest linią delikatną, ostro zarysowaną, o wypukłej krzywiźnie, dwie linie sytuują się w głównej części immunoelktroforegramu w rejonie B (jedna należy do strefy *alfa*, a druga opasuje dołek startowy). Niekiedy zauważalne mogą być słabe linie w rejonie C.

Aktywność wobec *beta*-naftylooctanu (aktywność esterazowa) widoczna jest jako mocna linia ułożona wzdłuż rowka z immunosurowicą, biegnąca do anody i opasująca swym dokatodowym końcem dołek startowy. Aktywność wobec *beta*-naftylofosforanu sodu nie jest widoczna.

Nasieniowód (rys. 5) zachowuje w zasadzie obraz stwierdzany dla wydzieliny ogona najądrza i to tak dla frakcji białkowych, jak i dwóch wykazywanych aktywności enzymatycznych.

Ampułka nasieniowodu (rys. 5) nie wykazała linii w rejonie A, natomiast ujawniła bardzo mocną linię w rejonie B (w strefie *alfa/beta*). Linia ta umiejscawiała się w bezpośrednim sąsiedztwie rowka z surowicą odpornościową, a wzdłuż tej linii widoczna była barwna reakcja z *beta*-naftylofosforanem sodu i Fast Blue RR, zaznaczająca się żółtobrązowym kolorem.

Intensywna aktywność esterazowa widoczna jest w nowo pojawiają-

cej się linii w strefie *beta*, a w śladowych ilościach występuje także w strefie *alfa* i *gamma*.

Gruczoł pęcherzykowy (rys. 5) zawierał tylko śladowe linie precypitacyjne, wybarwiające się barwnikami na białka. Grupowały się one głównie w rejonie B (strefa *alfa/beta*) i także śladowo mogły być widoczne w rejonie C (strefa *gamma*). Nie stwierdzono aktywności enzymatycznej ani wobec octanu *beta*-naftyłu, ani *beta*-naftylofosforanu sodu.

Gruczoł krokowy (rys. 5) ujawnił bardzo silną linię w rejonie B—C, niemal centralnie opasującą dołek startowy, oraz ślad słabej linii w rejonie C.

Bardzo intensywna aktywność esterazowa jest widoczna w linii biegnącej od dołka startowego w kierunku katody; linia ta leży w rejonach B i C i wykazuje wgłębienie charakterystyczne dla niejednorodności antygenowej.

W wydzielinie gruczołu krokowego nie wykazano aktywności wobec *beta*-naftylofosforanu sodu.

W plazmie nasienia ejakulowanego aktywność esteraz karboksylowych, zaznaczona czerwono fiołkową barwą, po inkubacji w *beta*-naftylooctanie i Diazo Bleu B jest widoczna na wysokości albumin (najprawdopodobniej związana z frakcją *ro*), a także w strefie *alfa*, *beta* i *gamma*.

Aktywność fosfatazy zasadowej ujawniona żółtobrazową barwą po inkubacji z *beta*-naftylofosforanem sodu i Fast Blue RR widoczna jest w linii leżącej w strefie *alfa*, a dochodzi do strefy albumin. Po wewnętrznej stronie jej krzywizny może być widoczna druga, krótsza, szaroniebiesko zabarwiona linia.

DYSKUSJA

Na wstępie wypada przytoczyć ograniczenia odnoszące się do uzyskanych wyników, a płynące z niemożności zastosowania różnych, o wąskiej swoistości substratów oraz inhibitorów odpowiednich aktywności enzymatycznych, a także ogólnie istniejące ograniczenie immunoprecypitacji, której końcowy efekt w sposób istotny zależy od wartości stosowanej surowicy odpornościowej. Kolejnym ograniczeniem jest brak pewności, czy wydzielina z poszczególnych odcinków narządu rozrodczego — brana po uboju ogierów — nie zawiera domieszki wydzieliny innych odcinków, aby być może również i składowych przeciętych i masowanych tkanek.

Z zachowaniem więc ostrożności omawiamy dotychczasowe spostrzeżenia. Porównanie wyników, uzyskanych w badaniach nad pełną plazmą nasienia i wydzielinami poszczególnych odcinków narządu rozrodczego ogiera, pozwala wskazać miejsce wytwarzania niektórych jej składowych.

Stosowana przez nas surowica odpornościowa wykrywała od 9 do 11 frakcji białkowych:

- trzy lub cztery wykryte były w wydzielinie ogona najądrza i powtórzyły się w zawartości nasieniowodu,
- cztery wystąpiły w wydzielinie ampułki,
- dwie śladowe linie widniały w wydzielinie gruczołu pęcherzykowego,
- jedna bardzo mocna cechowała wydzielinę prostaty, a oprócz niej widoczna była także rozciągnięta w strefie *gamma* pojedyncza słaba linia.

Tak więc, wydzieliny ogona najądrza, nasieniowodu i ampułki nasieniowodu wykazały obecność większości frakcji białkowych występujących w plazmie nasienia niefrakcjonowanego (pełnego). Wydzielina gruczołu pęcherzykowego okazała się bowiem bardzo uboga, zawierała jedynie ślady linii precypitacyjnych. Gruczoł krokowy natomiast cechował się bardzo mocną jedną linią w strefie *beta*, centralnie niemal opasującą dołek startowy. Frakcja ta w kierunku doanodowym gubi się w jednej z głównych frakcji rejonu B (z linią od strony rowka z immunosurowicą), co mogłoby sugerować ich częściowe pokrewieństwo antygenowe (rys. 4).

Analiza aktywności niespecyficznych esteraz (rys. 5) pozwala wnioskować, że zawartość ogona najądrza i nasieniowodu cechuje się *alfa*-esterazą, ampłka nasieniowodu wykazuje głównie aktywność *beta*-esterazy, a wydzielina gruczołu pęcherzykowego w ogóle nie wykazała aktywności esterazowej u jednego ogiera, u drugiego zaś wystąpił nikły ślad w doanodowym końcu zymogramu. Gruczoł krokowy ujawnił *beta* i *gamma* esterazę w układzie pokrewieństwa antygenowego.

Obraz aktywności esterazowej, widoczny w próbkach ejakulatów niefrakcjonowanych, wyraża zatem udział poszczególnych form tego enzymu, wytwarzanych w różnych odcinkach narządu rozrodczego ogiera. Jaka jest ich swoistość tkankowa i w jakich granicach można odnosić zmiany w ich obrazie do stanu czynnościowego odcinka, z którego te izoenzymy pochodzą, pozostaje do ustalenia.

Również jedną z pilniejszych prac, jakie należy podjąć, jest określenie zmian w obrazie białek i aktywności enzymatycznej plazmy nasienia, wynikających z czasu i sposobu jej przechowywania.

PIŚMIENICTWO

1. Balbierz H., Boryczko Z., Nikołajczuk M., Tischner M.: Identyfikacja frakcji białkowych plazmy nasienia z różnych odcinków wydzielniczych narządu rozrodczego buhaja. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 176, 1975.
2. Balbierz H., Boryczko Z., Kosiniak K., Nikołajczuk M.: Immunologiczne badania plazmy nasienia ogiera. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 176. 1975.

3. Herrmann W. P.: Immunology of Reproduction. Proc. of the Second Intern. Symp. held in Varna, Bulgaria, 1971. Bulg. Acad. Sci. Press, 143, 1973.
4. Herrmann W. P., Shirren C.: cyt. za 7.
5. Leithoff H., Leithoff I.: cyt. za 7.
6. Niłolajczuk M., Balbierz H., Kosiniak K.: Oznaczanie niektórych układow enzymatycznych plazmy nasienia ogiera. Zesz. probl. Post. Nauk rol. 176, 1975.
7. Shulman S., Tien Shun Li.: Immunology of Reproduction. Proc. of the Sec. Intern. Symp. held in Varna, Bulgaria, 1971. Bulg. Acad. Sci. Press, 1973.

Генрик Бальбеж, Владыслав Беляньски, Казимеж Косиняк, Мария Ниїолоайчук

ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛАЗМЫ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО СЕМЕНИ И СЕКРЕТА ИЗ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ ПОЛОВОГО ОРГАНА ЖЕРЕБЦА

Резюме

Целью труда было определение картины фракции белка, карбоксиловых эстераз, щелочной и кислой фосфатазы в фракционированном семени жеребцов и в секретах отобранных после убоя из хвоста придатка семенника, ампулы семяпровода, пузырчатой железы и предстательной железы.

Проводили электрофоретическую сепарацию в крахмальном желе, при крашении электрофореграмм на белки, вызывая одновременно активность неспецифических эстераз с помощью бета-нафтилоацетата и диазоаевоы соли диазо Блю Б, щелочной фосфатазы с помощью бета-нафтилофосфата натрия и Фаст Блю РР, кислой фосфатазы с помощью натриевой соли фенолфталеинофосфатной кислоты и NH_3 , как средства алкализующего после инкубации в растворе субстрата.

Фракции белков и активность энзимов исследовали также после простой электрофоретической сепарации в агаровом желе и в иммуноэлектрофореграммах, при применении иммунной сыворотки против полной плазмы семени жеребца.

Составление протеинограмм и зимограмм позволило установить тесное электрофоретическое сходство кислой и щелочной фосфатазы, как в крахмальном или агаровом желе, так и в АИЕ.

Карбоксиловые эстеразы в семени жеребца могут обнаруживать электрофоретическую альфа-, бета- и реже гамма-миграцию, равно как и могут быть обнаружены во фракции отвечающей по всей вероятности фракции γ_0 . По отношению к секретам из отдельных частей установлено, что альфа-эстераза находилась в секрете из хвоста придатка семенника и семяпровода, тогда как бета-эстераза находилась в ампуле семяпровода. В пузырчатой железе не можно было обнаружить эстеразной активности, тогда как в секрете из предстательной железы находились бета- и гамма-эстеразы со свойствами антигенной родственности. Активность щелочной фосфатазы была обнаружена в секрете ампулы.

Число и локализация фракций белка в секретах из отдельных участков были изменчивыми. Было возможным сведение некоторых преципитационных линий к картине плазмы полного семени.

Авторы считают, что продолжение принятой формы исследования и анализа состава плазмы семени жеребца может быть пригодным в оценке как физиологии так и патологии самца.

Henryk Balbierz, Władysław Bielański, Kazimierz Kosiniak, Maria Nikolajczuk

INVESTIGATIONS OF PLASMA OF FRACTIONED SEMEN AND OF SECRETION
FROM PARTS OF THE SEXUAL ORGAN OF A STALLION

Summary

The aim of the work was to establish the picture of protein fractions, carboxylic esterases, alkaline and acid phosphatase in the fractioned semen of stallions and in secretions taken after slaughter from the cauda epididymidis, vas deferens ampullae of vasa deferentia, vesicular gland and prostate.

The electrophoretical separation in starch gel was made, while staining the electrophoregrams to proteins and parallelly bringing about nonspecific esterases at use of *beta*-naphthylacetate and diazonic salt of diazo Blue B; alkaline phosphatase at use of sodium *beta*-naphthylphosphate and Fast Blue RR, acid phosphatase at use of sodium salt of phenolphthaleinodiphosphoric acid, NH_3 as an alkalizing agent after incubation in the substrate solution.

The fractions of proteins and the activity of enzymes were investigated also after the simple electrophoretic separation in agar gel and in immunoelectrophoregrams, at use of the immune serum against full plasma of the stallion semen.

Setting up proteinograms and zymograms enabled to prove a close electrophoretic similarity of acid and alkaline phosphatase, both in starch and agar gel and in AIE.

Carboxylesterases in the stallion semen can show the *alpha*-, *beta*- or seldom *gamma*-electrophoretic migration as well as can be visible in the fraction corresponding probably with the fraction *rho*. As far as secretions from particular sectors is concerned, it has been proved the presence of *alpha*-esterase in the secretion from the cauda epididymidis and that from the vas deferens, while *beta*-esterase was found in the ampullae of vasa deferentia. In the vesicular gland no esterase activity has been proved, while in the secretion from the prostate gland *beta*- and *gamma*- esterases with antigenic affinity features were visible. The alkaline phosphatase activity was detected in the vial secretion.

The number and location of the protein fraction in secretions from particular sectors was variable one. It was possible to relate some precipitation lines to the full semen picture.

The authors are of the opinion that the continuity of the assumed form of the investigation and analysis of the stallion semen plasma composition can be of use in the estimation of both physiology and pathology of a male.

Prof. dr hab. Henryk Balbierz
Wydział Weterynaryjny AR
Instytut Patologii i Terapii Zwierząt
Zakład Immunopatologii i Immunogenetyki
50-366 Wrocław, Pl. Grunwaldzki 47