

IMMUNOLOGICZNE BADANIA PŁAZMY NASIENIA OGIERA *

*Henryk Balbierz, Zdzisław Boryczko, Kazimierz Kosiniak,
Maria Nikolajczuk*

Zakład Immunopatologii i Immunogenetyki Instytutu Patologii i Terapii Zwierząt,
Wydział Weterynaryjny we Wrocławiu

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Henryk Balbierz
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Ryszard Badura

Instytut Stosowanej Fizjologii Zwierząt w Krakowie
Dyrektor: prof. dr hab. Władysław Bielański

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Katowicach
Kierownik: doc. dr hab. Antoni Furowicz

W poprzednich naszych publikacjach, dotyczących buhajów [1, 2], proponowaliśmy wprowadzenie do rutynowych badań nasienia także niektórych metod laboratoryjnych, z myślą, że stanowią one mogą wydatną pomoc w trudnej — z klinicznego punktu widzenia — ocenie narządu rozrodczego samca. Zakładaliśmy — podkreślając to z naciskiem — że bardzo pomocne w tych dociekaniach byłoby ustalenie miejsca wytwarzania składowych plazmy w poszczególnych odcinkach lub dodatkowych gruczołach męskiego narządu rozrodczego.

W obecnej publikacji przedstawiamy część wyników naszych badań, zmierzających do poznania składowych plazmy nasienia ogiera, w podobnym aspekcie, jak to uczyniliśmy dla buhaja [3].

MATERIAŁ I METODY

Badaliśmy próbki plazmy nasienia pochodzącego z pełnych ejakulatów 20 ogierów (14 Mur-insulanów, w tym 10 młodych, dwuletnich, 4 szlachetnych w typie półkrwi, 2 pogrubionych). Nasienie uzyskiwano przy użyciu sztucznej pochwy, model Kraków—66. Każdy ejakulat bez-

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

pośrednio po pobraniu poddawano ocenie makro- i mikroskopowej [5], a następnie wirowano przez 15 min przy 3000 obr/min, celem oddzielenia plazmy od elementów morfotycznych.

Plazmę poddano badaniom elektroforetycznym w żelu agarowym (tzw. elektroforeza prosta), podwójnej dyfuzji oraz immunoelektroforezie. Elektroforezę prostą prowadzono w warunkach podanych przez Grabara [6], a IE w modyfikacji Scheideggera oraz w warunkach podanych przez Matouška [9], a także w buforze mleczanowym wg Wieme [10].

Do wywołania reakcji immunologicznych stosowaliśmy surowice odpornościowe skierowane przeciw plazmie nasienia ogiera oraz przeciw normalnej surowicy krwi koni — uzyskane we własnym zakresie na królikach. Po rozwinięciu precypitacji preparaty barwiono czernią amidową lub czerwienią pąsową, stosując się do ogólnie przyjętych zasad.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Najczytelniejsze elektroforegramy z prostego rozdziału plazmy uzyskaliśmy w warunkach podanych przez Grabara i w dalszym ciągu ten system rozdziału elektroforetycznego będzie przedstawiany i omawiany. Wyniki rozdziału, otrzymane tą metodą, przedstawiono na rysunku 1.

Stwierdziliśmy, że elektroforegramy plazmy nasienia ogierów dorosłych wykazują obecność frakcji zróżnicowanych od osobnika do osobnika w następującym układzie:

— najbardziej w kierunku anody jest wysunięta słaba nie zawsze widoczna frakcja odpowiadająca albuminom surowicy krwi;

— w centralnej części proteinogramu, bliżej dołka startowego, 2 lub 3 frakcje o bardzo podobnej migracji, wyraźnie zaznaczone (niekiedy między nimi a frakcją poprzednią może występować wąskie i ostro odgraniczone pasmo); w tej części sytuują się białka z grupy glikoprotein (rys. 2), a także białka o aktywności enzymatycznej, o której szerzej będzie mowa w kolejnym doniesieniu;

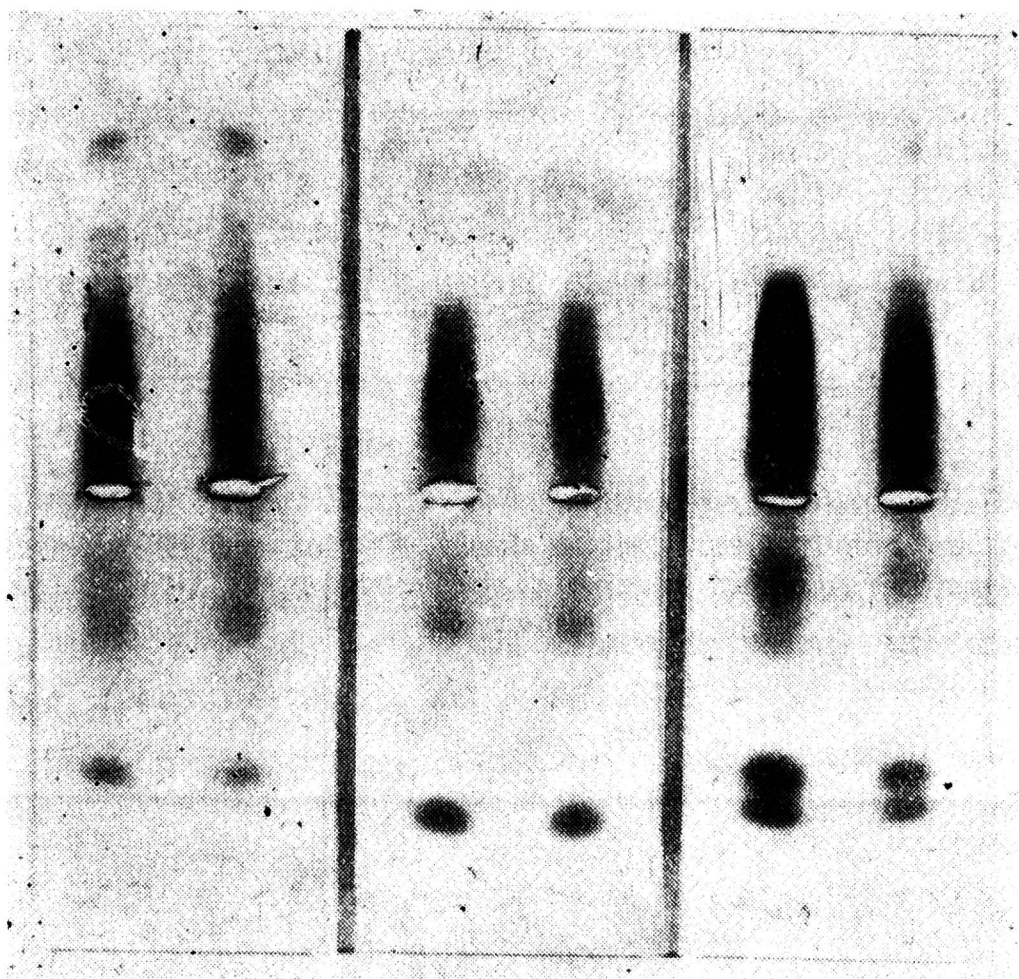
— w dokatodowej części, poczynając od linii startu, pojawiają się 2 lub 3 frakcje o zmiennym natężeniu;

— najbardziej dokatodowo stwierdza się 2 blisko siebie leżące frakcje lub każdą z nich występującą oddzielnie.

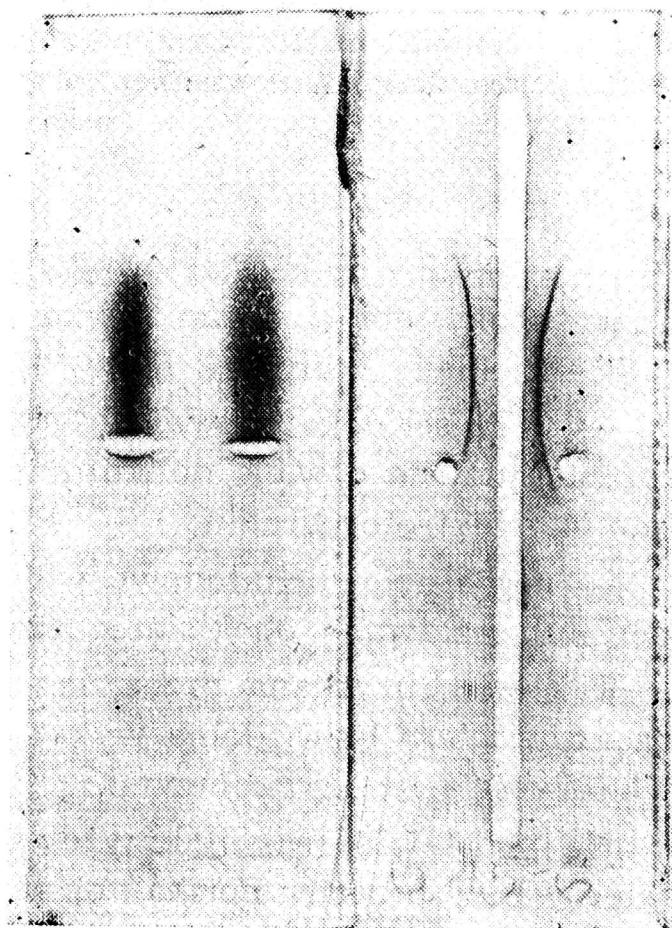
Wzorując się na koncepcji Shulmana [8] oraz Herrmanna [7] dokonaliśmy podziału proteinogramu i immunoelektroforegramu na umowne strefy, oznaczone literami zgodnie z malejącą szybkością migracji — od A począwszy (rys. 3).

W immunoelektroforegramie podczas analizy najczęściej stwierdzano:

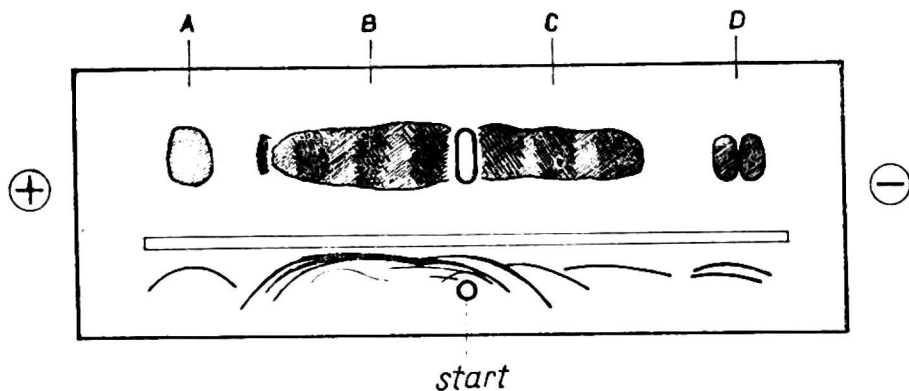
— najbardziej doanodowo wyraźny, pojedynczy łuk, odpowiadający umiejscowieniem albuminom;



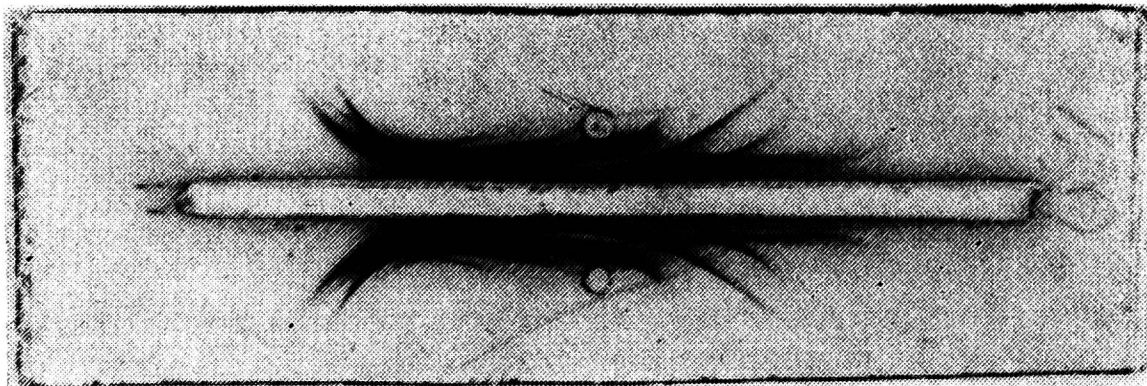
Rys. 1. Elektroforegram prostego rozdziału w żelu agarowym plazmy nasienia ogierów. Na preparatach od lewej: plazmą ogiera *J*, w środku — ogiera *D*, na prawym — ogiera *G*; w lewych dołkach startowych: plazma z pierwszego ejakulatu, w prawych z drugiego ejakulatu



Rys. 2. Elektroforegramy plazmy nasienia barwione na glikoproteidy. Preparat od lewej — po prostym rozdziale, prawy po immunoelektroforezie



Rys. 3. Schemat z oznaczeniem umownych stref migracji — po rozdziale prostym (część górna), po immunoelektroforezie (część dolna) — plazmy nasienia ogiera. Rozdział elektroforetyczny w warunkach podanych przez Grabara dla surowicy człowieka



Rys. 4. Immunoelktroforegram plazmy nasienia dorosłego ogiera w okresie eksploatacji rozrodczej. W rowku centralnym immunosurowica przeciw pełnej plazmie nasienia ogiera

— w okolicy dołka startowego i w strefie doanodowej lokują się dwie, leżące obok siebie i blisko rowka centralnego linie precypitacyjne, opasujące niekiedy mały łuk leżący na pograniczu z albuminą;

— w części dokatodowej obserwujemy nałożenie się mocnej linii precypitacyjnej na o wiele delikatniejsze 3-4 linie występujące w tej części immunoelktroforegramu;

— najbardziej dokatodowo widoczny jest łuk o dość zmiennej lokalizacji lub też dwa — obok siebie leżące.

Tak więc uzyskana przez nas surowica skierowana przeciw plazmie nasienia ogiera była zdolna wykazać co najmniej 9 frakcji różniących się właściwościami antygenowymi.

Na podstawie reakcji krzyżowych, wykonanych z użyciem surowicy skierowanej przeciw normalnej surowicy konia, można wnioskować, że

co najmniej dwie składowe plazmy nasienia są antygenowo podobne lub identyczne ze składnikami surowicy krwi konia.

W podwójnej dyfuzji uzyskano 3-4 linie precypitacyjne, zmieniające się w topografii od osobnika do osobnika.

W odniesieniu do przedstawianego gdzie indziej rozdziału plazmy nasienia ogiera na bibule [4] zauważa się zgodność w zmiennym stężeniu frakcji odpowiadającej albuminom, w stłoczeniu składowych stref alfa i beta, oraz w części katodowej obecność wąskiej, o różnej koncentracji, ostro zarysowanej frakcji.

W analogicznych badaniach nad nasieniem człowieka ustalono obraz frakcji białkowych, z których część zdołano zidentyfikować pod względem biochemicznym i zlokalizować miejsce ich powstawania [7, 8]. Podejmowane były również próby zastosowania badań immunologicznych do klinicznej oceny narządu rozrodczego [11].

W omówieniu naszej pracy podkreślamy różnicowanie osobnicze składu białek plazmy nasienia ogiera — co wiąże się prawdopodobnie z dużą rozpiętością poziomu białka całkowitego [4] — i powoduje znaczną różnorodność obrazów immunoelektroforetycznych.

Niektóre próbki nie wykazały np. linii w rejonie A; w rejonie B, prócz dwóch głównych równolegle biegnących łuków precypitacyjnych, w ich doanodowym rozejściu rzadko była widoczna jeszcze jedna bardzo delikatna linia precypitacyjna. W innych próbkach nie było głównej linii precypitacyjnej, leżącej w rejonie B w bezpośrednim sąsiedztwie rowka z immunosurowicą. Linia ta łączy się z leżącą bardziej ku katodzie, również bardzo wyraźną linią o migracji *beta*, co świadczy o pokrewieństwie antygenowym tych frakcji.

Układ frakcji w rejonie D znajduje potwierdzenie w rozdziale w żelu krochmalowym i sugeruje, że może być wynikiem działania kodominującej pary alleli.

Z kolejnych doniesień dzisiaj przedstawianych wyłoni się możliwość częściowej lokalizacji wytwarzania niektórych omawianych składowych w konkretnych odcinkach części gruczołowej narządu rozrodczego ogiera. Mimo to nadal istnieje potrzeba opracowania wpływu sezonu, użytkowania, wieku, potrzeba ustalenia na większym niż to mogliśmy uczynić materiale — indywidualnych właściwości ogiera; istnieje bowiem konieczność ustalenia granic różnicowania osobniczego i wahań fizjologicznych oraz dynamiki zmian w okresie dojrzewania samca. Takie opracowania są równie potrzebne, jak analiza wydzielin poszczególnych odcinków narządu rozrodczego, aby interpretacja wyników badań laboratoryjnych mogła przerodzić się w interpretację kliniczną.

PIŚMIENNICTWO

1. Balbierz H., Niokołajczuk M.: Arch. Immun. Ther., 18, 5, 537, 1970.
2. Balbierz H., Niokołajczuk M., Senze A., Stehlik Z.: Pol. Arch. wet. 14, 1, 99, 1971.
3. Balbierz H., Boryczko Z., Niokołajczuk M., Tischner M.: Identyfikacja frakcji białkowych plazmy nasienia z różnych odcinków wydzielniczych narządu rozrodczego buhaja. Oddano do druku.
4. Balbierz H., Niokołajczuk M., Kosiniak K.: Wstępne badania nad białkami plazmy nasienia ogiera. Oddano do druku.
5. Bielański W.: Rozród zwierząt. PWRiL Warszawa; 1972.
6. Grabar P., Burtin P.: Analyse immuno-électrophorétique. Masson et C-ie Edit., Paris 1960.
7. Herrmann W. P.: Immunology of Reproduction. Proc. of the Second Intern. Symp. held in Varna, Bulgaria 1971. Bulgarian Acad. of Sci. Press, 143, Sofia 1973.
8. Shulman S., Tien Shun Li: Immunology of Reproduction. Proc. of the Second Intern. Symp. held in Varna, Bulgaria 1971. Bulg. Acad. Sci. Press, Sofia, 133, 1973.
9. Valenta M., Matoušek P., Petrovsky E., Stratil A.: Proc. of the 9th European Anim. Blood Group Conf. Publ. House of the Czechoslovak Acad. of Sci. Prague 1965.
10. Wieme R. J.: Agar gel electrophoresis. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam—London—New York, 1965.
11. Zimmermann i wsp.: cyt. za 8.

Генрик Бальбеж, Здзислав Борычко, Казимеж Косиняк, Мария Николайчук

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛАЗМЫ СЕМЕНИ ЖЕРЕБЦА

Резюме

Исследовали образцы семени из полных эякулятов отобранных от 20 жеребцов разного экстерьера. Каждый эякулят непосредственно после отбора подвергали стандартной макро- и микроскопной оценке, а затем центрифугировали для получения плазмы.

Проводили электрофоретическую сепарацию плазмы в крахмальном желе, а также иммунодиффузию и иммуноэлектрофорез.

Чтобы вызвать иммунологическую реакцию, применяли иммунные сыворотки направленные против плазмы семени и против нормальной сыворотки крови лошади.

Как в простом электрофорезе так и в иммуноэлектрофорезе были выделены 4 зоны, в которых накапливалось в общем числе 9-11 фракций.

Наиболее прикатодное расположение показывал белок, который, как можно предполагать, характеризуется полиморфизмом обусловленным парой ко-доминирующих генов.

На основании перекрестных реакций между исследуемыми иммуносыворотками с одной стороны и плазмой семени и сывороткой крови лошади — с другой, можно заключать, что по крайней мере два компонента семени антигенно сходные или идентичные с двумя компонентами сыворотки крови.

Установлены значительные различия между образцами плазмы отдельных жеребцов, а также между очередными эякулятами одного и того же жеребца. Исследования продолжаются.

Henryk Balbierz, Zdzisław Boryczko, Kazimierz Kosiniak, Maria Nikołajczuk

IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS ON SEMEN PLASMA IN STALLION

S u m m a r y

Samples of semen plasma from full ejaculates taken from 20 stallions of different exterior were investigated. Each ejaculate immediately after sampling was subject to the standard micro- and macroscopic test and then it was centrifuged to obtain plasma.

The electrophoretic separation of plasma in the starch gel as well as immunodiffusion and immunoelectrophoresis were carried out.

For provoking immunological reaction immune sera directed against semen plasma and against normal horse blood serum were applied.

Both in simple electrophoresis and in immunoelectrophoresis 4 regions were distinguished, in which in total 9-11 fractions were accumulated.

It was protein, which was situated at most at the by-cathode side, and which, as it can be presumed, would show the polymorphism depending on a couple of co-dominating genes.

On the basis of cross reactions among the immunosera investigated and the semen plasma on the one hand and the horse blood serum in the other, it can be concluded that at least two semen components would be antigenically similar or identical with two blood serum components.

A considerable differentiation among the plasma samples of particular stallions as well as among subsequent ejaculates of the same stallion have been found. The investigations are continued.

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