

OZNACZANIE NIEKTÓRYCH UKŁADÓW ENZYMATYCZNYCH PLAZMY NASIENIA OGIERA *

Maria Nikołajczuk, Henryk Balbierz, Kazimierz Kosiniak

Zakład Immunopatologii i Immunogenetyki, Instytut 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, Wydział Zootechniczny w Krakowie

Dyrektor: prof. dr hab. Władysław Bielański

Ciągle poszukiwania nowych sposobów, które pozwoliłyby wnikliwiej poznać *l'interieur* ustrojów wyższych, obejmują swym zasięgiem coraz to nowe grupy składników organizmu. Dzięki temu ostatnio w immunogenetyce [1, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13], a także w diagnostyce klinicznej chętnie wykorzystywane są dla wspomnianych celów właściwości enzymatyczne niektórych układów bądź ich polimorfizm, stanowiący dodatkowy czynnik różnicowania [11].

Herrmann [4] podaje, że w plazmie nasienia człowieka występują, wśród niespecyficznego esterazy, dwa enzymy o ruchliwości *alfa*₂ i *gamma*. Trzecia forma tego enzymu o ruchliwości elektroforetycznej *beta* została wykryta w nasieniu patologicznym. Evrev i wsp. [2] w badaniach nad nasieniem człowieka ustalili, że aktywność esterazy *alfa* i *beta*, jak również aktywność kwaśnej i zasadowej fosfatazy pochodzą z plazmy nasienia, natomiast esteraza migrująca ku katodzie pochodzi z plemników; jest również obecna w wyciągach z jąder, prostaty i wątroby, a według Herrmanna [4] w wyciągach także innych narządów (najądrzy, pęcherzyków nasiennych, migdałków oraz skóry).

Podjęliśmy nasze badania pragnęliśmy ustalić przeciętny obraz zymogramów niektórych enzymów, wybierając na początek esterazy kar-

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 0.9.3.1., koordynowanego przez Polską Akademię Nauk.

boksyłowe, fosfatazę zasadową i kwaśną. Sądzymy, że możliwość kontroli nie tylko frakcji białka, lecz także poszczególnych enzymów i ich form polimorficznych mogłaby być wykorzystana dla orzekania o zahamowaniu funkcji wydzielniczej tych odcinków narządu rozrodczego ogiera, w których enzymy te są produkowane.

MATERIAŁ I METODY

Rozdział plazmy pełnego nasienia ogierów prowadzono w żelu krochmalowym, hydrolizowanym we własnym laboratorium, w nieciągłym układzie buforów (bufor żelu — Tris/kwas cytrynowy, pH 6,8; bufor waznien — wodorotlenek sodu/kwas borny, pH 8,7 [8] w temperaturze około 5°C przy napięciu 160 V) dopóki linia boranowa nie oddaliła się od miejsca startu na odległość około 5,2 cm. W celu umiejscowienia w proteinogramie aktywności enzymów ścięte poziomo, kolejne warstwy żelu inkubowano w roztworach następujących substratów:

— dla esteraz karboksylowych stosowano octan *alfa*-naftyłu (lub octan *beta*-naftyłu) w buforze fosforanowym o pH 7,5 [14];

— dla fosfatazy zasadowej — *beta*-naftylofosforan sodowy w buforze boranowym o pH 9,0 [14];

— dla fosfatazy kwaśnej — sól sodową kwasu fenolftaleinodwufosforowego w buforze cytrynianowym o pH 6,0 [5]. Jako sole dwuazoniowe używano Diazo Blue B, Fast Blue B, Fast Blue RR, a w przypadku fosfatazy kwaśnej — miejsca jej aktywności wywoływano przez alkalizację amoniakiem.

Jedną warstwę barwiono na białka czernią amidową 10B. Wykonano także barwienie podwójne, tj. barwienie czernią amidową po uprzednim wywołaniu zymogramu. Elektroforezę agarową i immunoelektroforezę prowadzono w żelu agarowym Difco Noble o stężeniu 1,2% w buforze weronalowym o pH 8,2 według receptury podanej przez Grabara [3]. Surowicę odpornościową uzyskano we własnej pracowni, immunizując królika przeciw pełnej plazmie nasienia ogiera.

Immunoelektroforegramy wybarwiano czerwiecią pasową na białka oraz dla wykazania aktywności enzymatycznej inkubowano w stosownych roztworach substratów, podobnie jak elektroforegramy w żelu krochmalowym.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przedstawienie zymogramów uzyskanych po rozdziale elektroforetycznym w żelu krochmalowym wymaga, by uprzednio przedstawić proteinogram krochmalowy plazmy nasienia (rys. 1, strona lewa). Frakcje biał-

kowe plazmy nasienia ogierów widoczne są po obu stronach linii startu, aczkolwiek większość lokuje się w strefie doanodowej (rys. 1, strona lewa).



Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny plazmy nasienia ogiera w żelu krochmalowym. Część lewa — proteinogram barwiony czernią amidową 10B; część prawa — zymogram esteraz karboksylowych, określony aktywnością wobec octanu *beta*-naftyłu i diazo bleu B, a następnie wybarwiony czernią amidową 10B. Zaznaczony podział na strefy według migracji elektroforetycznej. Na stanowiskach szóstych od strony lewej — rozdzielona surowica krwi

Dla ułatwienia wprowadzamy umowne określenie stref, w jakich skupiają się rozdzielone elektroforetycznie frakcje białek.

Strefa I — najszybciej wędrująca do anody, zawiera ostro zarysowane frakcje o różnej liczbie i koncentracji, które to różnice wydają się być związane z osobniczą indywidualnością. W badanych przez nas próbkach występowały w ilości od 4-6. Jedna z nich usytuowaniem odpowiadała albuminie surowicy krwi.

Strefa II — obejmuje pozostałą część proteinogramu w strefie doanodowej do linii startu. Widoczne są w niej bardzo słabe i nieostro rozdzielone ślady obecności białek.

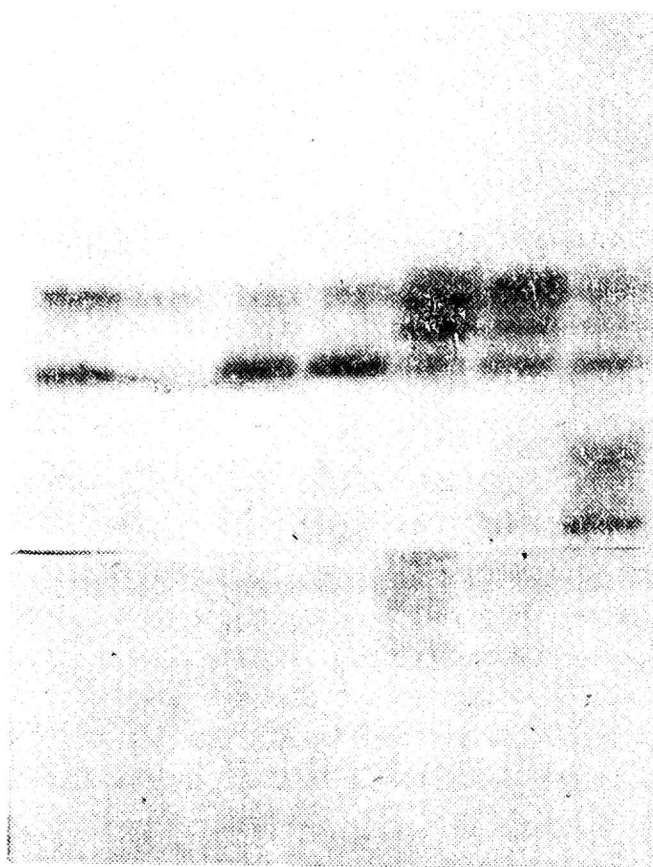
Strefa III — zajmuje dokatodową część zymogramu, od linii startu począwszy; może zawierać jedną, miękko zarysowaną frakcję.

Strefa IV — zawiera jedną powolną lub jedną szybką frakcję, albo obydwie równocześnie.

Czytelność proteinogramu jest zależna od stężenia poszczególnych frakcji w badanej próbce; jest bardzo różna od próbki do próbki i od osobnika do osobnika, stosownie do poziomu białka całkowitego zawartego w plazmie ejakulatu. U ogierów młodych, u których poziom białka całkowitego w plazmie wahał się w granicach 2,5 g w 100 ml, proteino-

gramy plazmy nasienia cechowała pozorna ubogość obrazu, wynikająca z delikatności rozdzielonych frakcji.

Zymogram esterazy hydrolizującej octan *alfa*-naftyłu wykazuje aktywność w kilkunastu pasmach, umiejscowionych tak w doanodowej, jak i w dokatodowej części elektroforegramu (rys. 2). W badanych przez nas

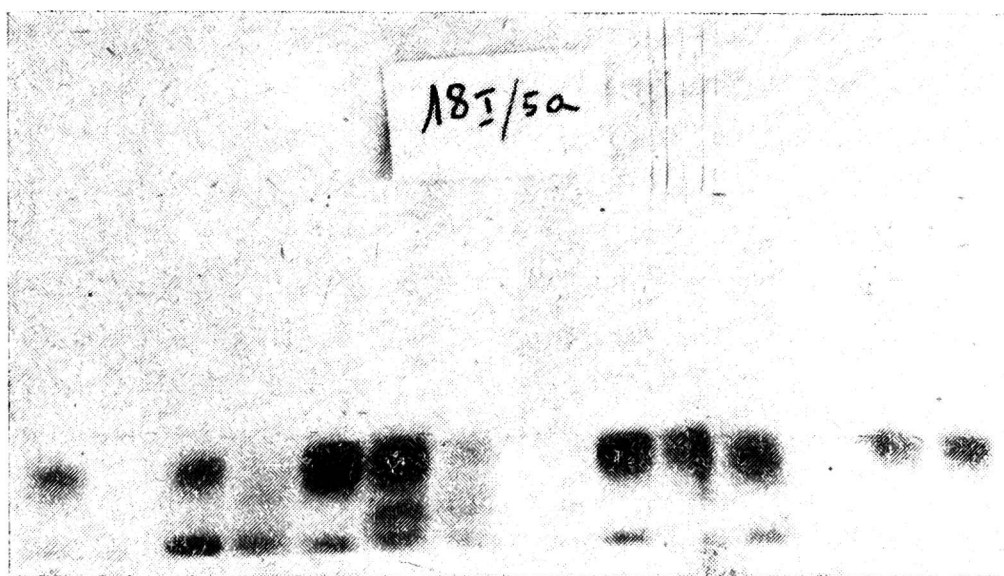


Rys. 2. Zymogram esteraż karboksylowych próbek plazmy nasienia różnych ogierów

próbek w części doanodowej skupiało się kilka dość ciasno ułożonych pasków aktywności lub tylko dwa w dość znacznej od siebie odległości. W kierunku doanodowym widoczne być może jedno wąskie pasmo aktywności, o dość szybkiej wędrówce doanodowej (prawdopodobnie związane z frakcją *ro*).

W dokatodowej części żelu, tuż za linią startu sytuują się pasma o słabej aktywności w różnej liczbie zależnie od próbki plazmy. Nałożenie zymogramu esteraż karboksylowych na omówiony proteinogram pozwala stwierdzić, iż najszybsze frakcje, wykazujące aktywność enzymatyczną, są umiejscowione w I strefie proteinogramu, powolniejsze z nich rozmieszczone są na trasie strefy II. Dokatodowa część zymogramu esteraż jest umiejscowiona w strefie III proteinogramu. Natomiast w IV strefie proteinogramu nie ujawniła się aktywność enzymatyczna w żadnej z badanych próbek nasienia (rys. 1, strona prawa).

Aktywność fosfatazy zasadowej (rys. 3) widoczna jest tylko po stronie doanodowej, w pobliżu linii startu (strefa II). Aktywność ta widoczna



Rys. 3. Zymogram fosfatazy zasadowej w plazmie nasienia ogierów. Migracja wyłącznie doanodowa

w dwóch pasmach: szerokim — o migracji szybszej, wąskim — leżącym przy linii startu. Niekiedy widoczne było w środku trzecie pasmo. Poszczególne próbki wykazywały bardzo zmienne natężenie, a w niektórych aktywność fosfatazy zasadowej była śladowa.

Zymogram fosfatazy kwaśnej pokrywa się z zymogramem fosfatazy zasadowej, tak co do lokalizacji miejsc aktywności, jak i ich mocy.

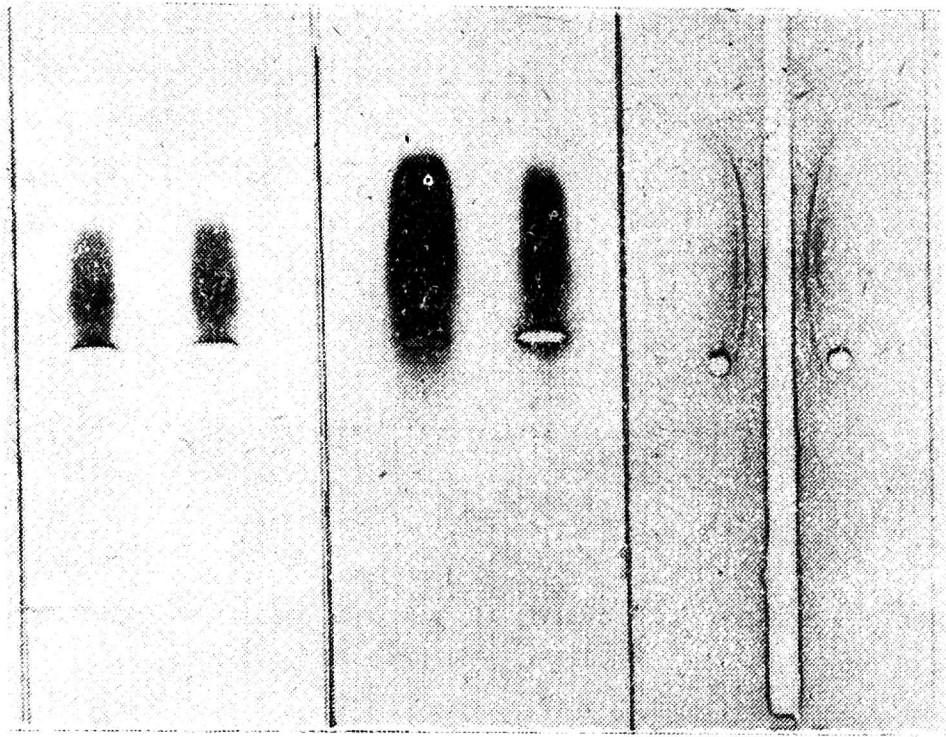
W żelu agarowym aktywność zasadowej i kwaśnej fosfatazy widoczna jest w rejonie B jako wyciągnięte od dołka startowego ku anodzie pasmo, niekiedy wykazujące cechy niejednorodności (rys. 4a), co jest zgodne z obrazem w żelu krochmalowym.

W immunoelektroforegramie (rys. 4b) rysuje się w tym rejonie linia precypitacyjna, wzdłuż której zaznacza się zarówno aktywność wobec *beta*-naftylofosforanu, jak i wobec fosforanu kwasu fenolftaleinodwufosforowego, tj. aktywność tak zasadowej, jak i kwaśnej fosfatazy. W odniesieniu do rozdziału frakcji białkowych umiejscowienie to odpowiada strefie migracji elektroforetycznej *alfa*.

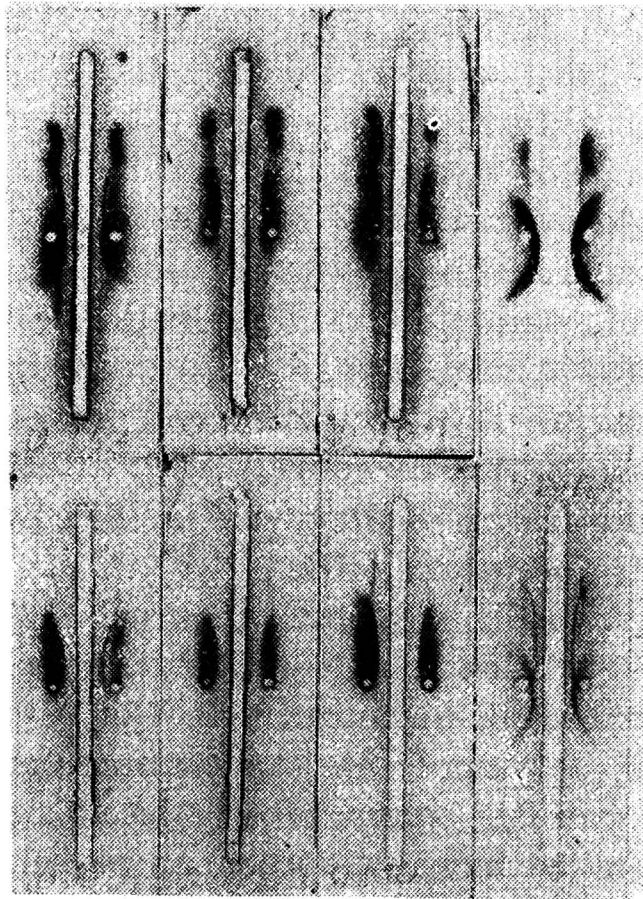
Ścisłe podobieństwo zymogramów krochmalowych, agarowych i immunoelektroforetycznych obydwu fosfataz jest stwierdzone także u człowieka i podawane w piśmiennictwie [2, 4].

W żelu agarowym aktywność enzymatyczna esteraz karboksylowych, obecnych w plazmie nasienia ogiera, może mieścić się w strefie *alfa*, *beta* i rzadko *gamma*, a także bywa widoczna na wysokości albumin i najprawdopodobniej odpowiada w tym przypadku frakcji *ro*.

Jak widać z zestawienia zymogramów pełnych ejakulatów ogierów (rys. 5), esterazy karboksylowe okazują pewne powinowactwo do *beta*-naftylofosforanu sodu, zaś fosfataza zasadowa także częściowo hydrolizuje octan *beta*-naftyłu (lub *alfa*-naftyłu).



Rys. 4. Elektroforegram agarowy plazmy nasienia ogiera. Wykazano aktywność fosfatazy zasadowej. Widoczna niejednorodność elektroforetyczna enzymu w rejonie *alfa*. W immunoelektroforegramie (preparat trzeci od lewej) widoczna w strefie *alfa* linia precypitacyjna, znacząca aktywność enzymu



Rys. 5. Zestawienie immunoelektroforegramów plazmy nasienia ogierów. Rząd górny — wywołana aktywność esteraz karboksylowych; rząd dolny — wywołana aktywność fosfatazy zasadowej. Widoczna migracja esterazy karboksylowej z szybkością *alfa*-, *beta*-, *gamma*- globulin oraz na wysokości albumin. Zaznaczona częściowa aktywność esteraz karboksylowych wobec *beta*-naftylofosforanu sodu oraz fosfatazy zasadowej wobec octanu *beta*-naftyłu

Polimorficzny obraz esteraz karboksylowych nasuwa myśl o wieloźródłowym ich pochodzeniu. Możliwe, że podobnie jak u człowieka [2], tylko część z tych enzymów jest charakterystyczna dla plazmy nasienia ogiera, a pozostałe pochodzić mogą z plemników bądź też ze zrębu tkanek. Pojawia się więc konieczność przypisania tych różnych form enzymów odpowiednim odcinkom wydzielniczym narządu rozrodczego ogiera. Rodzi się również pytanie, czy ze względów klinicznych i fizjologicznych, a także z punktu widzenia mrożenia nasienia, obojętne jest, czy oznaczanie aktywności enzymu odnosi się do jednej, czy też do paru jego form?

W kolejnej pracy staraliśmy się wykorzystać niektóre metody immunologicznego badania dla próby opracowania pierwszego zagadnienia, tj. obrazu wydzielin z poszczególnych odcinków narządu rozrodczego.

PIŚMIENNICTWO

1. Crimella C., Cerutti F., Rognoni G.: XIIth European Conf. on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism held in Budapest, 1970. Akademiai Kiadó, Budapest, 173, 1972.
2. Evrev T., Zbivkov S., Popivanov R., Kehayov, I., Podoplelov I. I., Glynsky I. A., Kryukov V. G.: Immunology of Reproduction. Proc. of the Sec. Intern. Symp. held in Varna, Bulgaria, 1971. Bulg. Acad. Sci. Press, 228, 1973.
3. Grabar P., Burtin P.: Analyse immuno-électrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques humains. Masson et C^{ie} Édít., Paris 1960.
4. Herrmann W. P.: Immunology of Reproduction. Proc. of the Sec. Intern. Symp. held in Varna, Bulgaria 1971. Bulg. Acad. Sci. Press, 1973.
5. Hopkinson D. A., Spencer N., Harries H.: Nature, Lond. 199, 969, 1963.
6. Kraay G. J.: XIIth Europ. Conf. on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism held in Budapest, 1970. Akad. Kiadó, Budapest, 155, 1972.
7. Podliachouk L., Balbierz H., Kaminski M., Nikołajczuk M., Strzelecka A.: XIIth Europ. Conf. on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism held in Budapest, 1970. Akad. Kiadó, Budapest 1970.
8. Sartore G.: Proc. of the XIth Europ. Conf. on Animal Blood Groups and Biochem. Polymorphism, Warszawa 1968. Funk Publ. the Hague, Pol. Sci. Publ. Warszawa 211, 1970.
9. Sartore G., Bruno R.: XIIth Europ. Conf. on Animal Blood Groups and Biochem. Polymorphism held in Budapest, 1970. Akad. Kiadó, Budapest, 185, 1972.
10. Scott A. M.: XIIth Europ. Conf. on Animal Blood Groups and Biochem. Polymorphism held in Budapest 1970. Akad. Kiadó, Budapest, 551, 1972.
11. Shulman S. and Tien Shun Li: Immunology of Reproduction. Proc. of the Sec. Intern. Symp. held in Varna 1971. Bulg. Acad. Sci. Press, 133, 1973.
12. Stormont C., Morris B. G., Yoshiko Suzuki: XIIth Europ. Conf. on Animal Blood Groups and Biochem. Polymorphism held in Budapest, 1970. Akad. Kiadó, Budapest, 187, 1972.
13. Veselský L.: XIIth Europ. Conf. on Animal Blood Groups and Biochem. Polymorphism held in Budapest, 1970. Akad. Kiadó, Budapest, 387, 1972.
14. Wieme R. J.: Agar gel electrophoresis. Elsevier Publishing Comp. Amsterdam—London-New York 1965.

Мария Николайчук, Генрик Бальбеж, Казимеж Косиняк

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ СХЕМ ПЛАЗМЫ СЕМЕНИ ЖЕРЕБЦА

Резюме

Определяли топографию сфер энзиматической активности — карбоксиловых эстераз, кислой и щелочной фосфатазы, полученных после электрофоретической сепарации плазмы семени жеребца. Сепарацию проводили либо в крахмальном желе (зимограммы), либо в агаровом желе (иммуноэлектрофореграммы), в наличие отдельных энзимов выявляли при использовании их гидролизующих свойств по отношению к соответствующим субстратам.

На зимограммах произведенных для установления наличия эстераз были обнаружены специфические полосы (фракции) в прианодной части и вблизи линии старта в прикатодной части.

Активность же кислой и щелочной фосфатаз проявилась лишь в прианодной части. Установлены также значительные различия в картине зимограмм с карбоксиловыми эстеразами при сепарации образцов плазмы семени разных жеребцов или у одного и того же жеребца в очередных отборах образцов.

Maria Nikolajczuk, Henryk Balbierz, Kazimierz Kosiniak

DIFFERENTIATION OF SOME ENZYMATIC PATTERNS OF THE STALLION SEMEN PLASMA

Summary

The topography of enzymatic activity regions — carboxyl-esterases, acid and alkaline phosphatase, obtained after the electrophoretic separation of the stallion semen plasma, was determined. The separation was accomplished either in starch gel (zymograms) or in agar gel (immuno-electrophoregrams), the presence of particular enzymes being detected at making use of their hydrolyzing properties in relation to appropriate substrates.

On zymograms developed for proving the presence of esterases, specific streaks (fractions) at the by-anode part and near the start line at the by-cathode part have been found.

As far as the activity of acid and alkaline phosphatase is concerned, it manifested itself at the by-anode part only. Also considerable differences in the picture of zymograms with carboxylesterases at the separation of semen plasma samples of different stallions and of the same stallion in subsequent samplings, have been found.

*Doc. dr hab. Maria Nikolajczuk
Wydział Weterynaryjny
Instytut Patologii i Terapii Zwierząt
Zakład Immunopatologii i Immunogenetyki
AR Wrocław, Pl. Grunwaldzki 47*