

WPŁYW RÓŻNYCH FRAKCJI ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO NA PODSTAWOWE PROCESY METABOLIZMU W PLEMNIKACH BUHAJA

STANISŁAW KORYCKI

Zakład Fizjologii Rozrodu i Laktacji Instytutu Fizjologii
i Żywienia Zwierząt PAN, Oddział w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr L. Jaśkowski

Od czasu gdy Lardy i Phillips (1940) wykryli, że żółtko jaja kurzego dodane do buforu fosforanowego wywiera korzystny wpływ na plemniki, chroniąc je przed udarem chłodowym i przedłużając ich żywotność, znalazło ono szerokie zastosowanie jako dodatek do różnych rozrzedzalników. Odkrycie tej właściwości żółtka przyczyniło się także do wszczęcia badań mających na celu możliwie wszechstronne poznanie jego oddziaływania.

Tosic i Walton (1945, 1947) badając oddychanie plemników buhaja w środowisku żółtkowym stwierdzili, że dodatek żółtka w znacznym stopniu pobudza ten proces, jednak spadek zużycia tlenu jest w obecności żółtka znacznie większy niż w czystym buforze. W badaniach nad wpływem różnych frakcji żółtka, uzyskanych na drodze dializy i ekstrakcji eterowej, na proces oddychania plemników autorzy ci wykazali, że spadek ten spowodowany jest przez dializującą frakcję żółtka oraz że zarówno białkowa, jak i tłuszczowa część frakcji niedializującej oddziałują jednako korzystnie.

Z prac Blackshowa i Salisbury'ego (1957) oraz Blackshowa, Salisbury'ego i Van Demarka (1957), nad czynnikami wpływającymi na czynność metaboliczną plemników, wynika, że dodatek żółtka do buforu znacznie podnosi zużycie substancji redukujących.

Hoelzer i Hanske (1952), Rikmenpoel (1957) oraz Lindahl i Wedin (1959) opisali metody uzyskiwania, głównie w drodze wirowania i sączenia, klarownego rozrzedzalnika żółtkowego, który ułatwia obserwację plemników pod mikroskopem.

W doświadczeniach nad konserwowaniem nasienia w temperaturze pokojowej (Jaśkowski i in., 1961, 1962) zastosowano m. in. jako

dodatek do buforu zamiast pełnego żółtka jego ciężką frakcję uzyskaną przez wirowanie. W badaniach laboratoryjnych modyfikacja ta okazała się korzystna, a różnice w czasie przeżywania plemników były statystycznie istotne.

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie, w jakim stopniu zaobserwowane różnice między właściwościami konserwacyjnymi całego żółtka a jego frakcji odwirowanej znajdują odzwierciedlenie w dwóch podstawowych procesach metabolicznych plemników, mianowicie w zużyciu tlenu i fruktozy, oraz jak te procesy kształtują się w środowisku pozostałych frakcji, które uzyskuje się obok odwirowanej.

M e t o d y k a

Fracje żółtka, którymi posługiwano się w doświadczeniu, przygotowywano w następujący sposób: rozrzedzalnik cytrynianowo-żółtkowy o 50-procentowej zawartości żółtka, z dodatkiem antybiotyków w ilości 30 mg penicyliny i 50 mg streptomycyny na 100 ml rozrzedzalnika, umieszczano w lodówce, w temperaturze 0° do +4°C. W ciągu około trzech dni następowała sedymentacja, po której odciągano górną, klarowną część rozrzedzalnika z nad nagromadzonego osadu. Osad poddawano następnie wirowaniu przy 2,5 tys. obrotów przez 15 do 20 minut, co powodowało utworzenie się kolejnych dwóch warstw, które oddzielano od siebie. W wyniku takiego postępowania uzyskano następujące frakcje, które użyte zostały jako oddzielne rozrzedzalniki:

S — górna, klarowna, płynna warstwa rozrzedzalnika cytrynianowo-żółtkowego, utworzona w czasie przechowywania go w lodówce

O — górna, płynna warstwa osadu, powstałego w czasie przechowywania rozrzedzalnika w lodówce, utworzona po jego wirowaniu

W — dolna, półpłynna warstwa, wytrącona z osadu w czasie jego wirowania, rozrzedzona roztworem cytrynianu sodu w stosunku 1 : 1

K — kontrolny, niefrakcjonowany rozrzedzalnik cytrynianowo-żółtkowy, przechowywany w identycznych warunkach.

Nasienie pobrane od buhajów z Zakładu Sztucznego Unasieniania Zwierząt w Bydgoszczy powoli ochładzano do temperatury pokojowej, a następnie dzielono je na cztery równe części, rozrzedzając każdą z nich odpowiednim rozrzedzalnikiem w stosunku 1 : 2 do 1 : 5 — do prób na zużycie tlenu oraz w stosunku 2 : 1 — do prób na zużycie fruktozy. Próby zużycia tlenu przeprowadzono na 10 ejakulatach o średniej gęstości $1,116 \pm 0,281$ mln komórek na 1 mm^3 i początkowej zawartości żywych plemników równej $71,5\% \pm 5,8\%$. Zużycie tlenu mierzono w aparacie Warburga, w atmosferze powietrza, w temperaturze 37°C, metodą cząstkowego ubytku (U m b r e i t, B u r r i s, S t a u f e r, 1957).

W doświadczeniu nad zużyciem fruktozy posługiwano się metodyką opisaną przez Manna (1948). Zbadano 10 ejakulatów o średniej gęstości $0,907 \pm 0,226$ mln komórek w 1 mm^3 nasienia i przy początkowej zawartości $70\% \pm 7,8\%$ żywych plemników. Próbkę do kolorymetrycznego oznaczania zawartości fruktozy pobierano po 0, 60, 120 i 180 minutach inkubacji w temperaturze 37°C . Na początku i na końcu każdego doświadczenia określano pod mikroskopem procent ruchliwych plemników.

Wyniki

Zużycie tlenu w poszczególnych frakcjach przedstawiono w tabeli 1. W ciągu 3 godzin inkubacji było ono we frakcji W — średnio o $8,9\%$ wyższe niż w niefrakcjonowanym rozrzedzalniku kontrolnym, we frakcji O — średnio o $3,6\%$ wyższe, zaś we frakcji S — średnio o $4,8\%$ niższe niż w rozrzedzalniku kontrolnym, przy czym zaznaczyła się wyraźna tendencja do wzrostu różnic w miarę upływu czasu.

Zużycie fruktozy, przedstawione w tabeli 2, było we frakcji W — średnio o $18,1\%$ wyższe, we frakcji O — średnio o $2,4\%$ wyższe, natomiast we frakcji S — o $1,4\%$ niższe niż w rozrzedzalniku kontrolnym.

Tabela 1

Zużycie tlenu przez 10^8 plemników w rozrzedzalniku cytrynianowo-żółtkowym i w różnych jego frakcjach (wyniki średnio z 10 prób)

Rodzaj rozrzedzalnika											
K			S			O			W		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Godzi- na inku- bacji	Ilość zuży- tego tlenu w μl	%	Ilość zuży- tego tlenu w μl	Róż- nica między S i K w μl	Róż- nica w %	Ilość zuży- tego tlenu w μl	Róż- nica między O i K w μl	Róż- nica w %	Ilość zuży- tego tlenu w μl	Róż- nica między W i K	Róż- nica w %
1.	16,6	100	16,0	-0,6	-3,6	17,2	+0,6	+3,6	17,8	+1,2	+7,2
2.	11,0	100	10,7	-0,3	-2,7	11,3	+0,3	+2,7	12,0	+1,0	+9,1
3.	8,1	100	7,3	-0,8	-9,9	8,5	+0,4	+4,9	9,1	+1,0	+12,3
Suma	35,7	100	34,0	-1,7	-4,8	37,0	+1,3	+3,6	38,9	+3,2	+8,9

W rubrykach 5, 8 i 11 podano różnice między zużyciem tlenu we frakcjach a w rozrzedzalniku kontrolnym, w rubrykach 6, 9 i 12 przedstawione są te same różnice w przeliczeniu na procenty, przy czym zużycie w rozrzedzalniku kontrolnym przyjęto za 100% .

Tabela 2

Zużycie fruktozy przez 10^9 plemników w rozrzedzalniku cytrynianowo-żółtkowym i w różnych jego frakcjach (wyniki średnio z 10 prób)

Rodzaj rozrzedzalnika											
K			S			O			W		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Godzina inkubacji	Ilość zużytej fruktozy w mg	%	Ilość zużytej fruktozy w mg	Różnica między S i K w mg	Różnica w %	Ilość zużytej fruktozy w mg	Różnica między O i K w mg	Różnica w %	Ilość zużytej fruktozy w mg	Różnica między W i K w mg	Różnica w %
1	1,032	100	1,079	+0,047	+4,5	1,224	+0,192	+18,6	1,343	+0,311	+30,1
2	1,101	100	1,030	-0,071	-6,5	1,108	+0,007	+0,6	1,326	+0,225	+20,4
3	0,931	100	0,914	-0,017	-1,9	0,806	-0,125	-13,5	0,950	+0,019	+2,0
Suma	3,064	100	3,023	-0,041	-1,4	3,138	+0,074	+2,4	3,619	+0,555	+18,1

W rubrykach 5, 8 i 11 oraz 6, 9 i 12 podano różnice podobnie jak w tab. 1.

Różnice w ilości zużytej fruktozy zmniejszały się w miarę upływu czasu, głównie wskutek wyczerpania się zasobu tego składnika szybciej w tym rozrzedzalniku, w którym jego zużycie następowało prędzej. W rozrzedzalniku np. z frakcją W, po 3-godzinnej inkubacji, często można było stwierdzić już tylko ślady fruktozy. Szereg średnich różnic między ilościami tlenu i fruktozy zużytymi w różnych środowiskach, przez tę samą ilość plemników, na jednostkę czasu, wyprowadzany metodą skorelowanych próbek „Studenta”, jest statystycznie znamieny. Na przykład dla średnich różnic między współczynnikami ZO_2 we frakcjach W i S oraz O i S, P jest mniejsze niż 0,01, a we frakcjach W i O oraz W i K — P waha się w granicach 0,05 a 0,01 (tab. 3). Podobnie kształtują się średnie różnice między wskaźnikami fruktolitycznymi (tab. 4). Różnice przeżywalności plemników okazały się w warunkach niniejszego doświadczenia nieistotne. Tłumaczyć to można, przynajmniej częściowo, zbyt krótkim okresem doświadczenia oraz możliwością nieobiektywnej oceny z powodu dużych różnic między właściwościami optycznymi poszczególnych rozrzedzalników.

Omówienie wyników

Przedstawione wyniki wskazują na to, że frakcje żółtka, wchodzące w skład rozrzedzalników, którymi posługiwano się w doświadczeniu, niejednakowo oddziałują na podstawowe procesy metaboliczne plemników,

Tabela 3

Zestawienie współczynników ZO_2 nasienia rozrzedzonego rozrzedzalnikami cytrynianowo-żółtkowym i różnymi jego frakcjami, inkubowanego w temp. $37^\circ C$ przez 180 min oraz ich różnic (wyniki średnie z 10 prób)

Rozrzedzalnik	Czas inkubacji (min.)	Współczynnik ZO_2 D + ED	Różnica między K a pozostałymi D + ED	Różnica między S a pozostałymi D + ED	Różnica między O a pozostałymi D + ED	Różnica między W a pozostałymi D + ED
K	60	$16,6 \pm 1,81$	—	$-0,58 \pm 0,39$	$+0,64 \pm 0,36$	$+1,25 \pm 0,44^{**}$
	120	$13,8 \pm 1,85$	—	$-0,41 \pm 0,34$	$+0,40 \pm 0,26$	$+1,13 \pm 0,39^{**}$
	180	$11,9 \pm 1,78$	—	$-0,54 \pm 0,25$	$+0,45 \pm 0,20$	$+1,12 \pm 0,32^{***}$
S	60	$16,0 \pm 1,97$	$+0,58 \pm 0,39$	—	$+1,22 \pm 0,27^{***}$	$+1,81 \pm 0,38^{***}$
	120	$13,4 \pm 1,97$	$+0,41 \pm 0,34$	—	$+0,81 \pm 0,24^{***}$	$+1,54 \pm 0,36^{***}$
	180	$11,3 \pm 1,76$	$+0,54 \pm 0,25$	—	$+0,99 \pm 0,12^{***}$	$+1,67 \pm 0,30^{***}$
O	60	$17,2 \pm 1,80$	$-0,64 \pm 0,36$	$-1,22 \pm 0,27^{***}$	—	$+0,61 \pm 0,25^*$
	120	$14,2 \pm 1,88$	$-0,40 \pm 0,26$	$-0,81 \pm 0,24^{***}$	—	$+0,73 \pm 0,24^{**}$
	180	$12,3 \pm 1,77$	$-0,45 \pm 0,20$	$-0,99 \pm 0,12^{***}$	—	$+0,67 \pm 0,25^*$
W	60	$17,8 \pm 1,85$	$-1,25 \pm 0,44^{**}$	$-1,81 \pm 0,38^{***}$	$-0,61 \pm 0,25^*$	—
	120	$14,9 \pm 1,93$	$-1,13 \pm 0,39^{**}$	$-1,54 \pm 0,36^{***}$	$-0,73 \pm 0,24^{**}$	—
	180	$13,0 \pm 1,91$	$-1,12 \pm 0,32^{***}$	$-1,67 \pm 0,30^{***}$	$-0,67 \pm 0,25^*$	—

e genda: * znaczne przy $P = 0,05$

** znaczne przy $P = 0,02$

*** znaczne przy $P = 0,01$

Tabela 4

Żestawienie wskaźników fruktolitycznych nasienia rozrzedzonego rozrzedzalnikiem cytrynianowo-żółtkowym i różnymi jego frakcjami w temp. 37°C przez 180 minut, oraz ich różnic (wyniki średnie z 10 prób)

Rozrzedzalnik	Czas inkubacji (min).	Wskaźnik fruktolityczny $D + E_D$	Różnica między K a pozostałymi $D + E_D$	Różnica między S a pozostałymi $D + E_D$	Różnica między O a pozostałymi $D + E_D$	Różnica między W a pozostałymi $D + E_D$
K	60	$1,032 \pm 0,140$	—	$+0,047 \pm 0,126$	$+0,193 \pm 0,135$	$+0,312 \pm 0,158$
	120	$1,067 \pm 0,096$	—	$-0,013 \pm 0,059$	$+0,099 \pm 0,049$	$+0,268 \pm 0,055^{***}$
	180	$1,021 \pm 0,100$	—	$-0,014 \pm 0,018$	$+0,026 \pm 0,020$	$+0,185 \pm 0,036^{***}$
S	60	$1,079 \pm 0,164$	$-0,047 \pm 0,126$	—	$+0,146 \pm 0,141$	$+0,165 \pm 0,104$
	120	$1,034 \pm 0,130$	$+0,013 \pm 0,059$	—	$+0,112 \pm 0,036^{**}$	$+0,281 \pm 0,032^{***}$
	180	$1,007 \pm 0,104$	$+0,014 \pm 0,018$	—	$+0,040 \pm 0,018^*$	$+0,199 \pm 0,034^{***}$
O	60	$1,225 \pm 0,230$	$-0,195 \pm 0,135$	$-0,146 \pm 0,141$	—	$+0,120 \pm 0,093$
	120	$1,166 \pm 0,130$	$-0,099 \pm 0,049$	$-0,112 \pm 0,036^{**}$	—	$+0,169 \pm 0,033^{***}$
	180	$1,046 \pm 0,114$	$-0,026 \pm 0,020$	$-0,040 \pm 0,018^*$	—	$+0,160 \pm 0,026^{***}$
W	60	$1,344 \pm 0,244$	$-0,312 \pm 0,158$	$-0,165 \pm 0,104$	$-0,120 \pm 0,093$	—
	120	$1,335 \pm 0,127$	$-0,268 \pm 0,055^{***}$	$-0,281 \pm 0,032^{***}$	$-0,169 \pm 0,033^{***s}$	—
	180	$1,207 \pm 0,127$	$-0,185 \pm 0,036^{***}$	$-0,199 \pm 0,034^{***}$	$-0,160 \pm 0,026^{***}$	—

Legenda: * znamienne przy $P = 0,05$

** znamienne przy $P = 0,02$

*** znamienne przy $P = 0,01$

w związku z czym niejednakowa wartość konserwacyjna tych frakcji wydaje się bardzo prawdopodobna. Na szczególną uwagę zasługuje najcięższa frakcja żółtka, w obecności której zużycie zarówno tlenu, jak i fruktozy było największe i znacznie odbiegało od aktywności, z jaką procesy te przebiegały w środowisku pozostałych frakcji oraz w rozrzedzalniku kontrolnym. Wpływ taki może okazać się dla konserwowania nasienia, przynajmniej w niektórych warunkach, nie bez znaczenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Blackshaw A. W., Salisbury G. W., Van Demark N. L. (1957) — J. Dairy Sci., XL, 1093.
2. Blackshaw A. W., Salisbury G. W. (1957) — J. Dairy Sci., XL, 1029.
3. Hoelzer H., Hanske (1952) — Der Eidotterverdünner und seine Filtration. Fortpfl. und Bes. der Haustiere, 2.
4. Jaśkowski L., Korycki St., Biwejnisk-Kłosowska D. (1961) — Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., z. 31. 143.
Probl. Post. Nauk Roln., z. 31. 143
5. Jaśkowski L., Biwejnisk-Kłosowska D., Korycki St. (1962) — Med. Wet. 1: XVIII. 34
6. Lindahl P. E., Wedin K. (1959) — Experientia, 15. 357
7. Mann T. (1948) — J. Agric. Sci., 38. 323
8. Pihillips P. H., Lardy H.A. (1940) — J. Dairy Sci, 23, 399.
9. Rikmenspoel (1957) — Experientia, 13, 124.
10. Tosic J., Walton A. (1945) — Nature, 156, 507.
11. Tosic J., Walton A. (1947) — J. Agric. Sci., 37. 69

Ст. Корыцки

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ ЖЕЛТКА КУРИНОГО ЯЙЦА НА ОСНОВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В ЖИВЧИКАХ БЫКА

Резюме

Цитратно-желтковый разбавитель, подверженный седиментации в холодильнике в течение ок. 72 часов, а потом центрифугированный, образует 3 фракции: тяжелую, которая осаждается на дне пробирки; рассеянную напоминающую начальный разбавитель и прозрачный супернатант. Во время инкубации в течение 3 часов разбавленного семени: а) цитратно-желтковым разбавителем, б) супернатантом. в) рассеянной фракцией и г) раствором цитрата натрия с добавлением 50% тяжелой фракции, установлено следующее потребление

кислорода 10^8 живчиками:

а) 35,7 мм³, б) 34,0 мм³, в) 37,0 мм³, г) 38,9 мм³, причем разницы между *г* и *абв* являлись статистически существенными.

Потребление фруктозы 10^9 живчиками составляло:

а) 3,064 мг, б) 3,023 мг, в) 3,138 мг, г) 3,619 мг. Разницы между *г* и *абв* являлись тоже статистически существенными.

St. Korycki

THE INFLUENCE OF EGG-YOLK FRACTIONS ON THE BASAL METABOLIC PROCESSES OF BULL SPERMATOOZOA

Summary

The yolk-citrate diluent, after sedimentation in the refrigerator for 72^h and centrifugation, forms three fractions, the heavy fraction, which remains on the bottom of the vial, the dispersed fraction, which resembles the initial diluent, and the clear supernatant. When bull spermatozoa were incubated for three hours in: a) egg-yolk citrate diluent, b) supernatant, c) the dispersed fraction and, d) citrate buffer with 50% of the heavy fraction, the following oxygen uptake by 10^8 spermatozoa was found: in a) 35,7 мм³, b) 34,0 мм³, c) 37,0 мм³, d) 38,9 мм³, the difference between d and abc being significant, and the following fructose utilization by 10^9 spermatozoa: in a) 3.064 mg, b) 3.023 mg, c) 3,138 mg, the difference between d and abc being also significant.