

BADANIA PORÓWNAWCZE NAD ZAWARTOŚCIĄ FRUKTOZY
I SKŁADEM AMINOKWASOWYM NORMALNEGO
I PATOLOGICZNEGO NASIENIA TRYKÓW

ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФРУКТОЗЫ И АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА
НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕРМЫ БАРАНОВ

COMPARATIVE STUDIES ON FRUCTOSE CONTENT AND AMINO ACID PATTERN
IN NORMAL AND PATHOLOGICAL SEMEN OF RAMS

L. Kastyak, J. Strzeżek

Pracownia Biologii Rozrodu i Inseminacji Katedry Hodowli Ogólnej Zwierząt WSR,
Olsztyn

Kierownik: dr Lesław Kastyak

Badaniami nad składem aminokwasów w nasieniu zwierząt gospodarskich zajmowali się między innymi: u buhajów — Zitle i O'Dell (1941), Sarkar (1947), Porter i współpracownicy (1951), Gassner i Hopwood (1952), De Vuyst i współpracownicy (1955, 1964), Bhargawa i współpracownicy (1959), u ogierów — Barria i Mancilla (1963), u knurów — Gonzales (1962), Krvavica i współpracownicy (1964), Szawkun (1964). Porównawcze badania nad zawartością aminokwasów w świeżym i przechowywanym nasieniu tryka i buhaja prowadził Szeregin (1959), a w nasieniu tryka, buhaja, knura i ogiera Josifow (1962). Graham i współpracownicy (1964) porównywali natomiast zawartość wolnych aminokwasów w plazmie buhaja, knura, koguta i indyka oraz w śluzie macicy krów w okresie rui.

Wszystkie wyżej wymienione prace dotyczyły określania zawartości aminokwasów w nasieniu i w plazmie nasiennej poszczególnych zwierząt lub zmian zachodzących w składzie aminokwasów w czasie przechowywania nasienia. W dostępnym jednakże piśmiennictwie spotkano stosunkowo małą liczbę prac poświęconych badaniu porównawczemu składu aminokwasów w nasieniu, przy uwzględnieniu jego jakości (normospermii i nasienia patologicznego). Te zaś, które się ukazały, dotyczyły przede wszystkim zawartości wolnych aminokwasów w nasieniu ludzkim — Krampitz i Doepfmer (1962), Tynecki i współpracownicy (1965), Krystosik i współpracownicy (1965) i zawartości wolnych

aminokwasów w nasieniu buhajów w zależności od ich wieku, jak również koncentracji, przeżywalności i morfologii plemników Hopwood i Gassner (1962).

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy było stwierdzenie, czy istnieją różnice w składzie aminokwasów normalnego i patologicznego nasienia tryków, jak również w stężeniu fruktozy, która zdaniem Manna (1964) jest wskaźnikiem prawidłowej czynności wewnątrzwydzielniczej jąder.

Materiał i metodyka

Do badań użyto nasienie pochodzące od ośmiu tryków w wieku 4—5 lat, rasy merynos i długowłnistej owcy polskiej, których jakość nasienia określano według ogólnie przyjętych zasad od szeregu miesięcy. Cztery tryki posiadały nasienie normalne — normospermia i stanowiły grupę pierwszą (2 merynosy + 2 długowłniste), natomiast cztery pozostałe tryki miały nasienie patologiczne (nekrospermia, teratospermia, oligospermia) i stanowiły grupę drugą (2 merynosy + 2 długowłniste).

Nasienie pobierano do sztucznej pochwy i określano następujące jego cechy: a) objętość ejakulatu w ml (odczytując ilość nasienia z kalibrowanego zbiorniczka); b) ruchliwość plemników (wg skali pięciopunktowej, przy temperaturze około 40° C); c) koncentrację plemników w 1 mm³ (plemniki liczono na komorze Bürkera w 40 prostokątach na dwóch siatkach); d) ilość plemników w ejakulacie (przemnażano objętość ejakulatu przez koncentrację plemników); e) procent plemników patologicznych (rozmary barwiono metodą Brendana-Farely, Eibl 1959); f) zawartość fruktozy w mg/100 ml nasienia (stosując metodę Roe zmodyfikowaną przez Manna 1948); g) zawartość aminokwasów w hydrolizatach białkowych plemników i plazmy nasiennej oraz wolne aminokwasy. Materiał do analizy przygotowywano wg metody Szergina (1959) z modyfikacjami wprowadzonymi przez Minakowskiego i Strzeżka (1966). Rozdział aminokwasów hydrolizatów białkowych plemników, plazmy nasiennej oraz wolnych aminokwasów dokonywano metodą wysokonapięciowej elektrochromatografii bibułowej wg Masłowskiego (1960), przystosowanej do nasienia przez Minakowskiego i Strzeżka (1966). Aminokwasy kwaśne i zasadowe rozdzielano elektroforetycznie przy pH 6,5, aminokwasy obojętne — elektrochromatograficznie przy pH 1,9. Wybarwione aminokwasy obrysowywano na bibule przestrzegając, aby krążki bibuły miały jednakową powierzchnię (przynajmniej dla tych samych aminokwasów), następnie je wycinano, porównywano ze standardami i oznaczano metodą Fischera i Dorfela (1953). Krążki bibuły z aminokwasami zanurzano w wywoływaczu miedziowym, po wysuszeniu cięto i umieszczano w 5 ml etanolu. Po całkowitej elucji trwającej 1 godzinę, otrzymany roztwór kolorymetrowano przy pomocy koloryme-

tru Lange VII, używając filtr 539. Odczyty kolorymetryczne porównywano z uprzednio sporządzoną dla każdego aminokwasu krzywą standardową i oznaczano ich zawartość.

Wyniki i ich omówienie

Charakterystykę wskaźników właściwości nasienia badanych dwóch grup tryków przedstawiono w tabeli 1. Pierwsza grupa tryków posia-

Tabela 1. Charakterystyka właściwości nasienia badanych tryków

Wskaźniki właściwości nasienia	Grupa I — nr tryka					Grupa II — nr tryka				
	883	40	209	00	\bar{x}	368	0511	0386	289	\bar{x}
Objętość ejakulatu w ml	1,27	1,04	1,25	1,21	1,19	1,37	1,52	0,77	1,22	1,20
Koncentracja plemników w 1 mm ³ w mln	3,46	3,45	3,08	2,24	3,06	2,52	1,81	1,34	0,91	1,63
Ilość plemników w ejakulacie w mld	4,43	3,56	3,85	2,74	3,64	3,48	2,64	1,05	1,15	2,04
Ruchliwość plemników	4,69	4,69	4,77	4,00	4,54	0	0	0	0	0
Procent plemników patologicznych	10,2	8,6	8,4	32,6	14,6	71,8	92,5	39,6	42,5	60,1
Zawartość fruktozy mg/100 ml	372	383	600	732	526	293	128	108	233	194

dała: średnią objętość ejakulatu — 1,19 ml, koncentrację plemników — 3,06 miliona, ilość plemników w ejakulacie — 3,64 miliarda, ruchliwość plemników — 4,54 i procent plemników patologicznych — 14,6 oraz średnią zawartość fruktozy — 526 mg%. Natomiast druga grupa tryków miała: średnią objętość ejakulatu — 1,20 ml, koncentrację plemników — 1,63 miliona, ilość plemników w ejakulacie — 2,04 miliarda, ruchliwość plemników — 0 i procent plemników patologicznych — 60,1 oraz średnią zawartość fruktozy — 194 mg%.

Różnice w wskaźnikach właściwości nasienia między dwoma wymienionymi grupami tryków dotyczyły szczególnie koncentracji plemników, ich ilości w ejakulacie, ruchliwości, procentu plemników patologicznych i zawartości fruktozy. Koncentracja plemników w II grupie tryków była około 50% niższa w porównaniu z grupą I, podobnie układała się ilość plemników w ejakulacie. Różnice między niektórymi wskaźnikami byłyby jeszcze wyższe, gdyby nie nasienie tryka 368 o stosunkowo wysokiej koncentracji plemników. Charakterystycznym zjawiskiem w II grupie był całkowity brak ruchliwości plemników (nekrospermia), bardzo wysoki procent plemników patologicznych (czterokrotnie wyższy — teratospermia), oraz prawie trzykrotnie niższa zawartość fruktozy. Te włas-

Tabela 2. Zmiany ilościowe aminokwasów w plemnikach, białkach plazmy i wolnych aminokwasów u poszczególnych tryków oraz w rozbiciu na dwie grupy charakteryzujące się nasieniem normalnym i patologicznym

Aminokwasy	G r u p a I — nr tryków																		
	883				40				209				00				x		
	P ^x	PB ^x	W ^x	P	BP	W	P	BP	W	P	BP	W	P	BP	W	P	BP	W	
<i>Zasadowe</i>																			
1. Arginina	7,20	1,93	0,13	8,2	2,02	0,17	6,03	2,25	0,10	5,08	2,28	0,12	6,84	2,12	0,11				
2. Lizyna	5,58	2,73	0,32	6,48	3,33	0,165	4,95	3,05	0,12	4,38	3,88	0,31	5,35	3,24	0,23				
3. Histydyna	1,52	0,88	0,02	1,95	0,75	+	1,38	0,75	0,04	0,78	0,65	0,07	1,41	0,76	0,04				
Ogólna zawartość	14,30	5,54	0,47	16,63	6,10	0,33	12,36	6,05	0,26	10,24	6,81	0,50	13,60	5,59	0,38				
<i>Kwaśne</i>																			
4. Kwas glutaminowy **	4,70	3,12	0,62	5,50	3,26	0,56	4,78	3,00	0,72	3,30	3,34	0,64	4,58	3,48	0,64				
5. Kwas asparaginowy	3,38	2,22	0,08	3,93	2,67	0,25	3,75	2,30	0,16	2,58	2,88	0,13	3,11	2,52	0,16				
Ogólna zawartość	8,08	5,34	0,70	9,43	5,93	0,81	9,34	5,30	0,88	5,88	6,22	0,77	7,69	6,00	0,80				
<i>Obojętne</i>																			
6. Leucyna	3,75	3,00	0,03	3,65	2,80	0,14	4,11	2,48	0,10	2,25	2,50	0,14	3,44	2,69	0,10				
7. Tyrozyna	3,10	2,55	—	2,20	2,65	0,03	2,25	2,05	+	2,32	2,22	—	2,47	2,37	0,007				
8. Fenyloalanina **	3,07	1,92	+	2,62	1,10	+	2,42	1,17	+	1,02	1,60	0,01	2,29	1,45	0,002				
9. Treonina	2,35	1,56	0,31	2,75	1,63	0,28	2,39	1,50	0,36	1,65	1,67	0,32	2,29	1,72	0,32				
10. Alanina	2,02	1,55	0,15	1,95	1,50	0,16	2,12	1,45	0,15	1,27	1,35	0,16	1,84	1,46	0,15				
11. Glicyna	1,72	1,34	0,14	1,68	1,18	0,18	2,13	1,28	0,14	1,11	1,06	0,13	1,66	1,22	0,14				
12. Cystyna	1,45	—	0,15	1,46	—	0,09	0,95	—	0,03	0,25	—	0,05	1,02	—	0,08				
13. Metionina	0,95	0,87	0,01	0,85	0,62	0,04	0,75	0,40	0,03	0,52	0,45	0,02	0,77	0,59	0,03				
14. Walina	1,08	1,11	—	1,08	0,94	—	1,03	0,73	—	0,83	0,76	—	1,01	0,89	—				
15. Seryna	1,05	0,95	0,13	0,95	1,01	0,20	0,97	1,00	0,24	0,78	0,53	0,14	0,94	0,87	0,18				
Ogólna zawartość	20,54	13,85	0,92	19,19	13,43	1,02	19,12	12,06	1,15	12,00	12,14	0,97	17,73	13,26	1,009				

nie różnice w wskaźnikach właściwości nasienia stały się podstawą do podziału tryków na dwie grupy i do przebadania zawartości aminokwasów, zarówno hydrolizatów białkowych plemników i plazmy nasiennej, jak i wolnych aminokwasów.

Wyniki badań przedstawiono w tabeli 2. Z danych w niej zawartych wynika, że w plemnikach obu grup tryków stwierdzono występowanie następujących aminokwasów: argininy, lizyny, histydyny, kwasu glutaminowego + treoniny, kwasu asparaginowego, leucyny + izoleucyny, tyrozyny, fenyloalaniny, alaniny, glicyny, cystyny, metioniny, waliny, seryny, przy czym zawartość ich kształtowała się nieco inaczej w I grupie niż w II grupie tryków. Tryki posiadające normalne nasienie (I grupa) miały wyższą zawartość wszystkich zidentyfikowanych aminokwasów w porównaniu do tryków posiadających obniżoną jakość nasienia (II grupa). Zjawisko niniejsze można w pewnym stopniu tłumaczyć mniejszą koncentracją plemników w nasieniu tryków II grupy w stosunku do koncentracji plemników w nasieniu I grupy, a w indywidualnych wypadkach również współzależnością między koncentracją plemników a zawartością poszczególnych aminokwasów.

W białkach plazmy nasiennej stwierdzono występowanie tych samych aminokwasów co w plemnikach, z tym, że w nasieniu I grupy nie zidentyfikowano cystyny. Można przypuszczać, że przyczyną występowania cystyny w plazmie nasiennej tryków II grupy była duża ilość plemników patologicznych. Należy podkreślić, że mimo stwierdzenia tych samych aminokwasów w plazmie nasiennej tryków I i II grupy, zawartość ich kształtowała się dość różnie. Na przykład zaobserwowano nieco większą ilość lizyny, histydyny, kwasu asparaginowego, fenyloalaniny w plazmie nasienia tryków II grupy. Przy podziale aminokwasów na zasadowe, kwaśne i obojętne, można zauważyć, że ilość aminokwasów zasadowych w II grupie była nieco większa niż w I grupie, zaś aminokwasów kwaśnych i obojętnych było więcej w plazmie nasiennej tryków I grupy.

Występowanie poszczególnych wolnych aminokwasów było takie same, jak w plemnikach i białkach plazmy nasiennej z tym jednak, że w nasieniu tryków I grupy nie zidentyfikowano waliny, a pozostałe aminokwasy występowały w mniejszych ilościach i niejednokrotnie określano je tylko jakościowo. Przy porównywaniu zawartości wolnych aminokwasów w nasieniu I i II grupy tryków, można zauważyć zwiększone ilości szczególnie aminokwasów zasadowych w II grupie, a zmniejszone ilości aminokwasów kwaśnych. Aminokwasy obojętne w większości wypadków występowały w nieco większych ilościach w nasieniu tryków II grupy, z wyjątkiem treoniny (która dawała na elektrochromatogramie zlewającą się plamę z kwasem glutaminowym i wyłączona została na podstawie ogólnie przyjętego stosunku 2:1) i seryny. Zjawisko niniejsze jest dość trudne do wyjaśnienia.

Dyskusja

Krampitz i Doepfmerd (1962) badając zawartość aminokwasów w plazmie nasiennej mężczyzn z normospermia, azospermia i aspermia stwierdzili, że ilość ich była najwyższa przy normospermii, niższa przy azospermii, a jeszcze niższa przy aspermii. Tynecki i współpracownicy (1965) zaobserwowali także niższy poziom wszystkich wolnych aminokwasów w plazmie patologicznego nasienia człowieka (przy podziale jego na trzy grupy ze względu na koncentrację plemników). Natomiast Krystosik i współpracownicy (1965) nie stwierdzili żadnej korelacji między wartością biologiczną nasienia, liczbą plemników, ich ruchliwością, a obecnością wolnych aminokwasów w nasieniu.

Badania Hopwood i Gassnera (1962) nad zawartością wolnych aminokwasów w nasieniu buhajów wskazały na zależność między ich ilością a jakością nasienia (koncentracją plemników, przeżywalnością i morfologią). W naszych badaniach zaobserwowano natomiast zależność między zawartością aminokwasów w plemnikach a jakością nasienia. Była ona jednak minimalna w porównaniu do zawartości aminokwasów w białkach plazmy i wolnych aminokwasów.

Krvavica i współpracownicy (1964) podają, że przy wysokiej koncentracji plemników w nasieniu knura zawartość między innymi kwasu glutaminowego jest wyższa, co znajduje potwierdzenie również w naszych badaniach. De Vuyst i współpracownicy (1964) badając skład aminokwasowy nasienia buhaja, stwierdzili wysoką zawartość argininy oraz korelację między zawartością kwasu glutaminowego i zdolnością zapładniającą nasienia. Obserwacja ta ma pewne odzwierciedlenie w naszych badaniach, gdyż stwierdzono wyższą zawartość kwasu glutaminowego w nasieniu normalnym, w porównaniu do nasienia o obniżonej jakości.

W świetle wyżej przedstawionych danych oraz ze względu na dość różne stosowanie metodyki określania zawartości aminokwasów, wydaje się celowe prowadzenie dalszych badań nad tym zagadnieniem.

PIŚMIENNICTWO

1. Barria N., Mancilla R. (1963): *Zoologia* 4, 81 (Ref. *Żurnał. Sier. Bioł.* 9, 58, 81, 1965).
2. Bhargava P. M., Bishop M. W. H., Work T. S. (1959): *The Biochem. J.* 73, 247.
3. De Vuyst A., Vervack W., Henriët L. (1955): *Zootech. e Vet.* 10, 331.
4. De Vuyst A., Henriët L., Vervack W., Arnauld R., Van Belle M., Morcels A. (1964): *V Congr. internaz. riproduz. anim. e fecondaz. artific.* Trento 3, 106.
5. Eibl K. (1959): *Lehrbuch der Rinderbesamung*, Berlin und Hamburg.
6. Fischer F. G., Dorfel H. (1953): *Biochem. Z.* 324, 544.
7. Gassner F. X., Hopwood M. L. (1952): *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* 81, 37.
8. Gonzales T. (1962): *Zootech. e Vet.* 17, 481.

9. Graham E. F., Johnson L. A., Fahning M. L. (1964): V Congr. internaz. riprod. anim. e fecondaz. artific. Trento 4, 381.
10. Hopwood M. L., Gassner F. X. (1962): Fert. a. Steril. 13, 290.
11. Iosifow K. (1962): Izw. int. bioł. i patoł. rozmnoż. 2, 71.
12. Krvavica S., Simunic V., Maloseja Z., Abram K. (1964): V Congr. internaz. riprod. anim. e fecondaz. artific. Trento 2, 446.
13. Krampitz G., Doepfmerd R. (1962): Nature (Lond. 194, 685.
14. Krystosik L., Trębicka-Kwiatkowska B., Bokinić M. (1965): I Sympozjum Sekcji Niepłodności Pol. Tow. Gin. Lublin 1963, Ref. 32, 207.
15. Mann T. (1948): J. Agric. Sci. 38, 323.
16. Mann T. (1964): The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract., London, New York.
17. Masłowski P. (1960): Roczn. Nauk Roln. 81-A-3, 561.
18. Minakowski W., Strzeżek J. (1966): Roczn. Nauk Roln. 88-B-3, 317.
19. Porter J. C., Shankman S., Melampy R. M. (1951): Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 77, 53.
20. Sarkar B. C. R., Luecke R. W., Duncan C. W. (1947): J. Biol. Chem. 171, 463.
21. Szawkun W. Ju. (1964): Fiziol. i Biochimija Silskogospod. Twarin. Wyp. 2 Kijew, 150 (Ref. Żurnał. Sier. Bioł. 15, 58, 77, 1965).
22. Szergin N. P. (1959): Trudy WIZ 23, 191.
23. Tynecki J., Boczkowski Z., Żrubek H., Doraczyński H., Choma R., Robak K. (1965): I Sympozjum Sekcji Niepłodności Pol. Tow. Gin. Lublin 1963, Ref. 31, 201.
24. Zittle C. A., O'Dell R. A. (1941): J. Biol. Chem. 140, 899 (cyt. za Mannem 1964).

РЕЗЮМЕ

Исследовано семя 8 баранов, из которых 4 барана имели нормальное семя (нормоспермия) — 1 группа, а 4 — патологическое семя (олигоспермия, тератоспермия и некроспермия) — 2 группа.

Установлено:

1. Содержание фруктозы в семени баранов 1-ой группы было выше (562 мг%) по сравнению с семенем 2 группы (194 мг%).

2. В сперматозоидах установлено присутствие: аргинина, лизина, гистидина, глутаминовой кислоты, треонина, аспарагиновой кислоты, лейцина, изолейцина, тирозина, фенилоаланина, аланина, глицина, цистина, метионина, валина, серина. Содержание их было выше в семени баранов 1 группы.

3. В гидролизатах белков плазмы семени те же аминокислоты за исключением 1-ой группы баранов, где не обнаружили цистина. Некоторые аминокислоты (лизин, гистидин, аспарагиновая кислота, фенилоаланин), выступали в большом количестве в белках семенной плазмы баранов 2-ой группы. Содержание щелочных аминокислот в белках плазмы 2-ой группы было выше, чем в 1-ой группе, но кислотных и нейтральных аминокислот было выше в белках плазмы 1-ой группы.

4. Содержание свободных аминокислот в большинстве случаев было выше в семени баранов 2-ой группы, но кислотных аминокислот в 1-ой группе было почти в два раза выше.

SUMMARY

The investigations carried out on semen of 8 rams where 4 possessed normal semen (normospermia) — 1st group and 4-the pathological one (oligospermia, teratospermia and necrospermia) — 2nd group have demonstrated, that: 1) the fructose content in semen of the 1st rams group was higher (562 mg%) than the fructose content in the 2nd rams group; 2) in spermatozoa the following amino acids were identified: arginine, lysine, histidine, glutamic acid + tyronine, aspartic, acid leucine + iso leucine, tyrosine, phenylalanine, threonine, alanine, glycine, cystine, methionine, valine and serine, but their quantity was higher in the semen of the 1st rams group; 3) in the proteins of semen plasma the same amino acids as in the spermatozoa, were found but in the semen of the 1st rams group the cystin was absent. Some amino acids (lysine, histidine, ascorbic acid, phenylalanine) were of higher quantity in the semen plasma proteins of the 2nd rams group. The content of basic amino acids in semen plasma of the 2nd rams group was higher than that of the 1st group, and the content of acidic and neutral amino acids was higher in semen plasma of the 1st rams group; 4) the content of free amino acids in majority of cases, was higher in semen of 2nd group rams, but this concerned mostly the basic amino acids and partly the neutral ones. The acidic amino acids in the 1st group were about two times more in the 2nd one.