

WPŁYW WYDZIELIN Z NIEKTÓRYCH ODCINKÓW NARZĄDÓW RODNYCH KRÓW NA WYBRANE WSKAŹNIKI METABOLIZMU PLEMNIKÓW BUHAJA

CZEŚĆ I. WYDZIELINY OD KRÓW BĘDĄCYCH W RUI

Józef Liminowicz

Zakład Zoohigieny Instytutu Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt AR-T
w Olsztynie

Kierownik Zakładu: doc. dr Lesław Kastyak

W ostatnich latach obserwuje się coraz więcej badań nad biologiczną rolą i chemicznym składem substancji, obecnych w plemnikach i komórkach jajowych wielu gatunków zwierząt. Pozwoliło to na określenie budowy chemicznej i funkcji niektórych struktur morfologicznych tych komórek w procesie zapłodnienia. O ile badania nad metabolizmem plemników i komórki jajowej oraz budową tych komórek zostały ostatnio dość znacznie zaawansowane, to badania w zakresie oddziaływania środowiska żeńskiego narządu rozrodczego na oba typy gamet są poznane słabo. Nie ulega wątpliwości, że w procesie zapłodnienia zjawiska te odgrywają znaczną rolę i w dużej mierze decydują o płodności i plenności zwierząt. Przebadanie tych współzależności staje się przeto ważne z punktu widzenia teoretycznego i praktycznego zarazem.

Określenie intensywności procesów metabolicznych plemników w obecności badanych wydzielin może pozwolić na bliższe poznanie ich właściwości fizjologicznych i biochemicznych w powiązaniu ze zdolnością zapłodniającą plemników, jednocześnie stać się może jednym ze wskaźników pozwalającym wyjaśnić niektóre przyczyny niepłodności.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Wskaźnikami metabolicznych przemian plemników w żeńskich drogach rozrodczych były następujące testy:

- 1) określenie zużycia tlenu,
- 2) określenie zużycia fruktozy.

Do badań pobierano wydzieliny z narządów płciowych od krów rasy nizinno czarno-białej, klinicznie zdrowych, ubijanych w Zakładzie Mięsnym w Olsztynie w wieku 3-7 lat.

Stan cyklu płciowego określano natychmiast po uboju na podstawie obserwacji przyżyciowych oraz wyglądu zewnętrznego pęcherzyka Graffa i narządów płciowych. Do badań pobierano wydzieliny od krów, których jajniki wykazywały typowe, nie budzące wątpliwości zmiany fizjologiczne, charakterystyczne dla fazy pęcherzykowej (w rui). Po ostatecznym określeniu fazy cyklu płciowego zeskrobywano łyżeczką kostną śluz wraz z nabłonkiem z szyjki, rogów macicy i jajowodów do oddzielnych naczynek przetrzymywanych na lodzie w temp. 0-2°C. W laboratorium zebrany z nabłonkiem śluz homogenizowano z płynem fizjologicznym w stosunku 1:1. Następnie homogenizat poddawano wirowaniu przez 0,5 godz przy 13 200 obr/min w temperaturze pokojowej. Otrzymany supernatant z dodatkiem ok. 2,5 mg streptomycyny na 5 ml wydzieliny przechowywano w fiolkach w temp. -10°C.

Nasienie do badań pobierano za pomocą sztucznej pochwy od buhajów rasy ncb w Zakładzie Sztucznego Unasieniania Zwierząt w Olsztynie. Każdy ejakulat był poddany wstępnej ocenie. Następnie ejakulatory od trzech samców mieszano razem, po czym rozdzielano na dwie części (do probówek) po 4 ml, które wirowano przy 2000 obr/min przez 10 minut. Następnie z jednej części oddzielono plazmę, w miejsce której dodano (tą samą ilość) buforu Petersona z 0,5% fruktozą [5]. Czynność tę powtarzano dwukrotnie, po czym plemniki obu części rozrzedzono buforem w stosunku 1:5. Następnie do naczynek reakcyjnych aparatu Warburga (z bocznym ramionkiem) wlewano 2-mililitrowe porcje plemników rozrzedzonych buforem Petersona oraz po 0,5 ml wydzielin z różnych odcinków narządów rodnych. Naczynka bez wydzielin służyły jako próby kontrolne. Wykonywano po 2 powtórzenia dla każdej próby. W jednej serii badań używano naczynek z plemnikami z plazmą i bez plazmy oraz naczynka tylko z buforem kontrolnym. W trakcie tej samej serii badań określano jednocześnie aktywność fruktolityczną i ilość zużytego tlenu.

Oznaczania zawartości fruktozy w nasieniu dokonywano w próbach przygotowanych do inkubacji oraz po inkubacji tych prób w aparacie Warburga. Stężenie fruktozy oznaczano metodą Roe [7], zmodyfikowaną dla nasienia przez Manna. Odczytów ekstynkcji badanych prób dokonywano za pomocą fotokolorymetru „Spekol”, przy długości fali 560 nm. Otrzymane ekstynkcje odczytywano z krzywej standardowej w mg%. Z wartości tych obliczono indeks fruktolizy, tj. wielkość zużycia fruktozy przez 10^9 plemników w ciągu jednej godziny w temp. 37°C.

Zużycie tlenu przez plemniki określano w czasie 3 godz. inkubacji

w temp. 37°C w aparacie Warburga, według metody podanej przez Umbreita [11]. Wyniki zużycia tlenu podawano w $\mu\text{l}/\text{godz}$ inkubowanych 10^8 plemników, co odpowiada tzw. współczynnikowi ZO_2 Redenza. Z ilości zużytego tlenu w ciągu 3 godz inkubacji obliczano w procentach dynamikę jego zużycia oraz średnie zużycie w ciągu jednej godziny. Wyniki badań poddano analizie wariancji.

WYNIKI

Zużycie tlenu. Największy współczynnik oddychania (ZO_2) wykazywały plemniki z plazmą inkubowane z wydzielinami z fazy pęcherzykowej (z jajowodów — 36,9, z rogów macicy — 34,3, z szyjki — 36,3; $P > 0,05$). Plemniki inkubowane bez plazmy z udziałem tych wydzielin wykazywały nieco mniejsze zużycie tlenu (z jajowodów — 31,5, z rogów macicy — 32,5, z szyjki — 33,8; $P > 0,05$; tab. 1).

Analiza wyników wykazała brak statystycznie istotnych różnic w ilości zużycia tlenu między grupami plemników z plazmą a plemnikami bez plazmy. Stwierdzono natomiast, że oddychanie plemników w próbach z dodatkiem wydzielin było statystycznie wyższe niż w próbach kontrolnych, które były rozrzedzone tylko buforem Petersona (bez wydzielin; $P < 0,01$).

Analogicznie przedstawia się aktywność fruktolityczna plemników, którą określano wielkością indeksu fruktolizy. Wielkość indeksów fruktolizy przedstawiono w tabeli 2. Wynika z niej, że najwyższy indeks fruktolizy stwierdzono dla plemników z plazmą, będących w środowisku tych wydzielin z szyjki — 2,75, z rogów macicy — 2,82, z jajowodów — 2,94). Niższy indeks fruktolizy wykazywały natomiast plemniki bez plazmy w obecności tych wydzielin (z szyjki — 1,85, z rogów macicy — 1,88, z jajowodów — 2,04). Różnicę statystycznie istotną ($P < 0,05$) stwierdzono tylko w stosunku do grup plemników z plazmą.

W badaniach porównawczych, przeprowadzonych nad określeniem przebiegu fruktolizy w naczynkach kontrolnych (plemniki w buforze bez wydzielin), stwierdzono statystycznie niższy indeks niż w próbach z dodatkiem wydzielin ($P < 0,01$).

DYSKUSJA

W toku przeprowadzonych badań ustalono, że wyższą aktywność wykazują plemniki inkubowane w środowisku wydzielin pobranych w pełnej fazie pęcherzykowej. Można przypuszczać, że intensywność metaboliczna tych plemników uwarunkowana była wpływem hormonów estrogennych, które jak sugeruje Lamar i wsp. [2], sprawują hormonalną

Tabela I

Zużycie tlenu w μl przez 10^8 plemników inkubowanych w temperaturze 37°C (bufor z 0,5 % fruktozy)

| Czas inkubacji w godz | Miana statystyczne | Plemniki z plazmą | | | | Plemniki bez plazmy | | | |
|-----------------------|--------------------|-------------------|--------|-------|------------------------|---------------------|-------|-----------|-------------------|
| | | woda destylowana | szyjki | rogów | wydzielina z jajowodów | szyjki | rogów | jajowodów | woda destylowana/ |
| 1 | \bar{x} | 23,42 | 44,35 | 42,22 | 49,40 | 45,11 | 41,19 | 43,10 | 20,32 |
| | Sx | 3,82 | 4,80 | 5,12 | 3,70 | 7,13 | 5,34 | 3,11 | 2,08 |
| 2 | \bar{x} | 18,13 | 36,18 | 33,68 | 34,32 | 30,68 | 32,07 | 28,25 | 14,42 |
| | Sx | 1,89 | 3,52 | 2,48 | 2,14 | 4,16 | 3,80 | 2,13 | 3,70 |
| \bar{x} % spadku | | 23,01 | 18,42 | 20,23 | 28,69 | 31,99 | 22,14 | 34,45 | 29,04 |
| 3 | \bar{x} | 14,23 | 28,45 | 27,15 | 28,32 | 25,62 | 24,21 | 23,19 | 7,30 |
| | Sx | 2,19 | 3,25 | 5,13 | 4,18 | 3,78 | 2,52 | 3,10 | 2,15 |
| \bar{x} % spadku | | 39,60 | 35,85 | 35,69 | 41,16 | 43,21 | 41,22 | 46,19 | 63,01 |
| x zużycie na godz | | 18,59 | 36,33 | 34,35 | 36,92 | 33,80 | 32,49 | 31,51 | 14,01 |
| Błąd standardowy | | 2,62 | 3,86 | 4,24 | 3,39 | 5,02 | 3,89 | 2,78 | 2,64 |

Tabela 2

Średnie wyniki zawartości fruktozy w badanych próbach i aktywność fruktolityczna plemników inkubowanych w temp. 37°C w ciągu 1 godz (bufor z 0,5% fruktozy)

| Wyszczególnienie | Plemniki z plazmą | | | | Plemniki bez plazmy (myte i odwirowane) | | | |
|------------------------------|-------------------|-------|------------------------|--------|---|-----------|------------------|------|
| | woda destylowana | | wydzielina z jajowodów | | woda destylowana | | woda destylowana | |
| | szyjki | rogów | jajowodów | szyjki | rogów | jajowodów | destylowana | |
| Stężenie fruktozy | \bar{x} | 403 | 413 | 405 | 279 | 285 | 287 | 261 |
| | Sx | 8,3 | 15,4 | 5,5 | 6,6 | 10,3 | 8,9 | 7,4 |
| po inkub. | \bar{x} | 192 | 162 | 151 | 108 | 111 | 99 | 183 |
| | Sx | 4,6 | 12,9 | 11,9 | 14,3 | 13,3 | 12,6 | 3,8 |
| \bar{x} % zużycia fruktozy | | 20,7 | 19,5 | 20,3 | 19,1 | 18,7 | 21,5 | 10,9 |
| Indeks fruktolizy | \bar{x} | 2,92 | 2,72 | 2,75 | 1,85 | 1,88 | 2,04 | 0,84 |
| | Sx | 0,87 | 1,17 | 1,13 | 0,31 | 0,35 | 0,49 | 0,20 |

kontrolę nad zachowaniem się plemników w narządach płciowych samicy.

Jak wiadomo, za skład chemiczny i właściwości fizyczne wydzieliny błony śluzowej dróg rodnych u ssaków i ptaków odpowiedzialne są estrogeny. Kształtują one również cechy morfologiczne i biochemiczne błony śluzowej i mięśniówki macicy.

Określone właściwości wydzieliny w czasie fazy pęcherzykowej mogły, w przypadku naszych badań, wpłynąć na zwiększenie aktywności metabolicznej plemników. Jak wiadomo, estrogeny związane z receptorami błony śluzowej macicy i uwolnione w czasie hemogenizowania mogły występować w wydzielinie i oddziaływać na metabolizm plemników za pośrednictwem cyklicznego AMP [8]. Z drugiej strony, mechanizm działania estrogenów polega, między innymi, na udziale ich w procesie przenoszenia protonów i elektronów w układach oddechowych [9]. Nie można również wykluczyć udziału innych czynników, np. fertilizyny w pobudzaniu metabolizmu plemników, co postuluje Thibault [10].

Stwierdzony w naszych badaniach wzrost zużycia tlenu przez plemniki inkubowane z wydzielinami fazy pęcherzykowej i wzrost indeksu fruktolizy zgodny jest ze spostrzeżeniami innych autorów. Murdoch i White zaobserwowali [4], mianowicie, wzrost pobierania tlenu i tlenowego metabolizmu glukozy przez plemniki inkubowane uprzednio w macicy królicy.

Zbliżone wyniki otrzymał również Black i wsp. [1] badając wpływ płynu pęcherzykowego jajnika, zebranego podczas rui, na intensywność zużycia tlenu przez plemniki tryka.

White i Wallace [12] uważają, że fosfodwuasteraza układu rozrodczego samicy powoduje rozszczepianie glicerofosfocholiny. Uwolniony enzymatycznie fosfoglicerol staje się źródłem energii dla plemników znajdujących się w żeńskich drogach płciowych. Przejawia się to, między innymi, zwiększoną intensywnością fruktolityczną. Wzrostowi fruktolizy towarzyszy zwykle wzrost ruchliwości plemników, co potwierdziły również nasze badania. Pincus [6] stwierdził, że śluz z narządów rodnych samicy, będących w fazie rui, pobudza plemniki do energicznych ruchów. Autor przypuszcza obecność substancji o właściwościach stymulujących metabolizm plemników.

PIŚMIENNICTWO

1. Black D. L., Leo V., Crowley R. T. Duby, Spilman C. H.: J. Reprod. Fert., 15, 127, 1968.
2. Lamar I. K., Sheftles L. B., Delfs E.: Am. J. Physiol., 129, 234, 1940.
3. Mann T.: J. Agric. Sci., Camb., 38, 2, 323, 1948.

4. Murdoch R. N., White J. G.: J. Reprod. Fert., 14, 213, 1967.
5. Peterson R. N., Freund M.: J. Reprod. Fert., 17, 357, 1968.
6. Pincus G.: The hormones, VI, Acad. Press. N. York. London 1965.
7. Roe J. H., Kusther C. A.: J. Biol. Chem. 147, 399.
8. Sutchlerland E. W., Oyi J., Butcher R. W.: Recent Progr. Hormone Res. 21, 623, 1965.
9. Talalay P., Williams-Ashman H. G.: Proc. Natn. Acad. Sci., 44, 15, 1958.
10. Thibault C.: Zesz. nauk WSR Kraków, 44, 213, 1968.
11. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.: Manometric techniques and tissue metabolis. Burgess Publ. Co Minneapolis Minn 1957.
12. White J. G., Wallace J. C.: Nature, Lond., 189, 843, 1961.

Юзеф Лиминович

ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОВ НЕКОТОРЫХ ЧАСТЕЙ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ КОРОВ НА МЕТАБОЛИЗМ СПЕРМИЕВ БЫКА

ЧАСТЬ I. ВЗЯТИЕ СЕКРЕТОВ ОТ КОРОВ В ПЕРИОД ТЕЧКИ

Резюме

В результате проведенных исследований не обнаружено статистически достоверных различий как в дыхании спермиев, так и в индексе фруктолиза среди проб, содержащих секреты исследуемых частей половых органов (шейки, рогов матки, яйцеводов).

В то же время установлено, что дыхание спермиев в пробах с добавкой секретов было значительно более интенсивным, нежели в пробах контрольных, разбавленных только буфером Петерсона (без секретов). Аналогичным образом изменяется и фруктолитическая активность.

Józef Liminowicz

EFFECT OF SECRETIONS FROM SOME PARTS OF COW GENERATIVE ORGANS ON METABOLISM OF BULL SPERMATOOZOA

PART I. SECRETIONS FROM COWS BEING ON HEAT

Summary

The study showed no significant differences in the respiration of bull spermatozoa and fructolysis index between the sperm samples containing secretions obtained from *cervix uteri*, *cornu uteri*, or *oviducts* of cows and those without the secretions added. However, it was found that the respiration of spermatozoa in the samples with the secretions added was significantly higher than in the control samples that were diluted with a Paterson's buffer only (without secretions added). The same was true for the course of fructolytic activity.

Mgr inż. Józef Liminowicz
Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie
Instytut Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt
Zakład Zootechniczny
Olsztyn-Kortowo