

WPLYW SUROWIC KRWI KRÓW BĘDĄCYCH W RÓŻNYCH OKRESACH CYKLU PŁCIOWEGO NA INDEKS FRUKTOLIZY NASIENIA BUHAJÓW

Lesław Kastyak, Józef Liminowicz, Izabella Łotoczko

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

Kierownik Zakładu: doc. dr Lesław Kastyak

W czasie poszczególnych faz cyklu płciowego zachodzą dość znaczne wahania w składzie chemicznym wydzielin dróg rodnych, jak również i we krwi. Jak wykazały badania, zmiany tych składników wpływają na metabolizm nasienia.

Black i wsp. [2], obserwując wpływ płynu jajnikowego owcy na zużycie tlenu przez plemniki tryka, stwierdzili, że wydzielina jajnika zebrana podczas rui pobudzała zużycie tlenu. Natomiast wydzielina zebrana 5 do 10 dnia po rui takiego działania nie wykazywała. Autorzy ci sugerują, że różnice w zużyciu tlenu przez plemniki wywołane są zmianami składu wydzieliny jajników w czasie trwania cyklu płciowego.

Freund i Mixner [4] porównywali wpływ niektórych hormonów (insuliny, adrenaliny, tyroksyny i trójjodotyroniny) oraz aminokwasów (ergotioniny i cysteiny) na fruktolizę. Stwierdzili oni, że dodatek adrenaliny powodował wstrzymanie fruktolizy, natomiast pozostałe hormony i aminokwasy nie miały wpływu na przebieg fruktolizy.

Liminowicz [6, 7, 8] badając wpływ wydzielin z narządów płciowych krów, będących w różnych fazach cyklu płciowego, na metabolizm plemników buhaja stwierdził, że u krów w fazie rui zużycie tlenu oraz fruktozy było większe w porównaniu do nasienia rozcieńczonego roztworami kontrolnymi. Natomiast plemniki rozcieńczone wyciągami z narządów płciowych krów będących w fazie lutealnej — na 8-10 dzień po owulacji — wykazywały mniejsze zużycie tlenu i fruktozy. Oddychanie, jak i aktywność fruktolityczna plemników rozcieńczonych wydzielinami krów będących we wczesnej fazie lutealnej była bardzo zmienna.

Warto podkreślić, że w czasie cyklu rujowego występują przede

wszystkim wahania w poziomie hormonów gonadotropowych. Poziom LH we krwi wykazuje pierwszy szczyt około 8 dnia cyklu, a następnie drugi — 15-22 godziny przed owulacją. W okresie ciąży poziom estrogenów we krwi jest bardzo niski. Szego i Roberts [cyt. za Bielańskim 1] znaleźli w 100 ml krwi dwóch krów w 6 miesiącu cieleności estrogeny w ilości równoznacznej zaledwie 0,36-0,38 mg estradiolu. Jak podaje Dobrowolski i wsp. [3], poziom progesteronu badany w żyły jajnikowej wykazuje u krów wzrost z 5,6 $\mu\text{g}/100$ ml osocza w 1 dniu cyklu do około 120 $\mu\text{g}/100$ ml w 8 dniu i do około 180 $\mu\text{g}/100$ ml na 14-15 dzień. Później następuje gwałtowny spadek poziomu do 10 lub 20 $\mu\text{g}/100$ ml w dniu owulacji. Hansel [5] sądzi, że prawdopodobnie w krwi żył jajnika progesteron znajduje się tylko w okresie czynnego ciała żółtego.

Grodziński i Marchlewski [cyt. za Mannem — 10] prowadzili badania nad wpływem surowic kurczenia na nasienie koguta. Zaobserwowali, że przy przechowywaniu nasienia w temp. 2°C przez okres do 8 dni i podwyższeniu temp. do 37°C plemniki wykazywały ruchliwość. Stwierdzili jednak, że plemniki aglutynowały się, gdy używano surowicy świeżej. Zjawisko to nie występowało, kiedy stosowano surowicę uprzednio trzymaną w temp. 55°C. Również Chang zaobserwował czynnik aglutynujący w świeżej surowicy krwi, który ulegał inaktywacji przez parodniowe przechowywanie jej w temp. 4°C. Semakov i Babičeva [12], badając działanie wydzielin jajowodu, macicy i niektórych innych płynów biologicznych, a między innymi surowicy krwi królicy i świni na plemniki, zaobserwowali, że wydzielina jajowodu i macicy królika poza organizmem uaktywniała ruch plemników i jednocześnie wywoływała aglutynację homologicznych plemników. Plemniki buhaja nie podlegały aglutynacji ani w jednym przypadku.

Celem niniejszej pracy jest stwierdzenie, jaki wpływ na zużycie fruktozy przez plemniki i szybkość fruktolizy mają surowice krwi, pochodzące od krów będących w różnych okresach cyklu płciowego.

MATERIAŁ I METODYKA

Nasienie do badań pobierano od buhajów rasy ncb, stacjonujących w WPZUZ Olsztyn. Każdy ejakulat poddawano ocenie wstępnej, w czasie której określano: objętość ejakulatu, ruchliwość i gęstość plemników. W wybranych do badań ejakulatach określano koncentrację plemników, posługując się komorą Burkera.

Surowicę otrzymywano z krwi pobranej z żyły jarzmowej krów będących: w okresie rui, 8-10 dni po rui i 18 dni po rui. Pobraną krew po skrzepnięciu wirowano przez 10 min, używając wirówki typu Unipan WE-2, przy 3500 obr/minutę. Odwirowaną surowicę porcjowano po 3 ml

do sterylnych probówek, szczelnie korkowano i przechowywano w temp. -20°C . Do badań brano 1 probówkę, którą rozmrażano w łaźni wodnej o temp. 37°C .

Celem określenia zawartości fruktozy i indeksu fruktolizy stosowano metodę Roe, zmodyfikowaną przez Manna [9]. Ze świeżo otrzymanego ejakulatu pobierano 0,3 ml nasienia, które wlewano do probówek umieszczonych w termosie o temp. 37°C . W probówce kontrolnej do nasienia dodawano 0,1 ml buforu Petersena ($0,14\text{M} - \text{NaCl}$, $0,003\text{M} - \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,0042\text{M} - \text{Na}_2\text{HPO}_4$, $0,00085\text{M} - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ i *aqua destilata* do 100 ml), a do probówek doświadczalnych 0,1 ml surowic od krów będących w różnych okresach cyklu płciowego. Po wymieszaniu pobierano 0,1 ml tej mieszaniny i przenoszono do uprzednio przygotowanych probówek z wodą destylowaną w ilości 1,9 mililitra. Następnie do każdej probówki dodawano 1 ml 2⁰/₀ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 1 ml 0,4⁰/₀ NaOH . Otrzymaną mieszaninę wstawiano do łaźni wodnej z gotującą wodą na około 2 min i następnie filtrowano przez sącdek. Z całości przesącza pobierano 2 ml klarownego roztworu i do niego dodawano 2 ml 0,1⁰/₀ roztworu rezorcyny i 6 ml 30⁰/₀ HCl . Po dodaniu tych odczynników próby wstawiano do łaźni wodnej o temp. $80-85^{\circ}\text{C}$ celem wywołania reakcji barwnej. Po 10 min próby oziębiano i przeprowadzano odczyty kolorymetryczne na kolorymetrze „Specol” firmy Carl Zeissa, nastawionym na długość fali 560. Celem przeliczenia otrzymanych wyników z odczytów kolorymetrycznych na rzeczywistą zawartość fruktozy w nasieniu posługiwano się uprzednio sporządzoną krzywą wzorcową, gdzie na osi odciętych zaznaczano zawartość fruktozy, a na osi rzędnych — odczyty z kolorimetru.

Zawartość fruktozy po rozcieńczeniu nasienia buforem lub różnymi surowicami określano: w godz 0 oraz po 30 i 60 minutach.

Przy obliczaniu różnic między próbami kontrolnymi a doświadczalnymi (z dodatkiem różnych surowic) obliczano średnie arytmetyczne, współczynniki zmienności i przeprowadzono analizę wariancji według Ruszczyca [11].

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych badań porównawczych nad wpływem surowic krwi krów znajdujących się w różnych okresach cyklu płciowego na indeks fruktolizy przedstawiono w tabeli 1. Z zawartych w niej danych widać, że indeks fruktolizy nie różnił się zasadniczo przy wszystkich stosowanych rozcieńczalnikach. Przy użyciu buforu Petersena wynosił — 1,056, surowicy krwi krowy w 8-10 dniach po rui — 1,190, surowicy krwi krowy będącej w rui — 1,141 i surowicy krwi krowy w 18

Tabela 1

Zmiany indeksu fruktolizy nasienia buhajów przy zastosowaniu różnych rozcieńczalników

Miana statystyczne	Bufor Petersena	Surowica krwi krowy		
		8-10 dni po rui	w okresie po rui	18 dni po rui
n	50	50	50	50
\bar{x}	1,056	1,19	1,141	1,099
Sx	0,49	0,63	0,58	0,52
Vx				
(w %)	46,8	52,9	51	48,2

dniu po rui — 1,0999. Jak z powyższego wynika, indeks fruktolizy najwyższy był, gdy używano jako rozcieńczalnika surowicy krwi krowy będącej 8-10 dni po rui i surowicy krwi krowy będącej w rui. Jednakże przeprowadzona analiza wariancji nie wykazała statystycznie istotnych różnic w zużyciu fruktozy przez plemniki buhaja przy zastosowaniu wspomnianych rozcieńczalników. Z obliczeń odchylenia standardowego wynika, że najmniejszy zakres zmienności wystąpił przy zastosowaniu buforu Petersena, największy natomiast przy użyciu surowicy krwi pobranej 8-10 dni po rui.

Kształtowanie się zużycia fruktozy w nasieniu buhajów przy użyciu badanych rozcieńczalników w ciągu 1 godz inkubacji w temp. 37°C przedstawiono w tabeli 2. Jak widać, intensywność spadku zawartości fruktozy była najmniejsza przy zastosowaniu, jako rozcieńczalnika, buforu Petersena, natomiast największa przy zastosowaniu surowicy krwi krowy będącej w rui, co sugerowałoby, że surowica ta zwiększa zużycie fruktozy w nasieniu buhaja, a tym samym wzmacnia metabolizm.

Tabela 2

Zawartość i zużycie fruktozy (w mg%) w poszczególnych odcinkach czasu

Rozcieńczalnik	Zawartość fruktozy w czasie (min)			Zużycie fruktozy w czasie (min)		
	0	30	60	0—30	0—60	30—60
	Bufor Petersena	490	310	255	180	235
Surowica krwi krowy 8—10 dni po rui	485	306	225	179	260	81
Surowica krwi krowy w okresie rui	487	306	204	181	283	102
Surowica krwi krowy 18 dni po rui	475	300	216	175	259	84

Należy podkreślić, że o ile w okresie inkubacji od 0 do 30 min zużycie fruktozy w poszczególnych rozcieńczalnikach było bardzo zbliżone i wahało się od 175 do 181 mg⁰%, to w okresie od 30 do 60 min można zaobserwować wyraźne różnicowanie. Plemniki znajdujące się w buforze Petersena zużyły tylko 55 mg⁰% fruktozy, podczas gdy plemniki rozcieńczone w surowicy krwi krowy, znajdującej się w rui, w tym samym czasie zużyły 102 mg⁰% fruktozy. Plemniki rozcieńczone w surowicach krwi krów znajdujących się 8-10 i 18 dni po rui zużyły od 81 do 84 mg⁰% fruktozy.

Przytoczone wyniki wskazują, że jakieś, bliżej nie znane czynniki znajdujące się w surowicy krwi krów będących w rui powodują większe zużycie fruktozy, szczególnie przy dłuższym przechowywaniu nasienia.

PIŚMIENNICTWO

1. Bielański W.: Rozród zwierząt gospodarskich. PWRiL, Warszawa 1963.
2. Black D. L., Leo V., Crowley D. R. T., Spilman C. H.: J. Reprod. Fert., 15, 127, 1968.
3. Dobrowolski W., Stupnicka E., Domański E.: J. Reprod. Fert., 15, 409, 1968.
4. Freund M., Mixner J. P.: J. Dairy Sci., 42, 74, 1959.
5. Hansel W.: The Estrus Cycle of the cow. W książce: Reproduction in Domestic Animals. London 1959.
6. Liminowicz J.: Wpływ wydzielin z niektórych odcinków narządów płciowych na metabolizm plemników buhaja. Cz. I. Wydzieliny krów będących w fazie rui. Zesz. probl. Post. Nauk roln. z. 176, 1975.
7. Liminowicz J.: Wpływ wydzielin z niektórych odcinków narządów płciowych na metabolizm plemników buhaja. Cz. II. Wydzieliny od krów u których jajnik znajdował się w wczesnej fazie lutealnej. Zesz. probl. Post. Nauk roln. z. 176, 1975.
8. Liminowicz J.: Wpływ wydzielin z niektórych odcinków narządów płciowych na metabolizm plemników buhaja. Cz. III. Wydzieliny od krów, których jajnik był w fazie lutealnej. Zesz. probl. Post. Nauk roln. z. 176, 1975.
9. Mann T.: J. Agric. Sci., 38, 323, 1948.
10. Mann T.: Biochemia nasienia. PWRiL, Warszawa 1958.
11. Ruszczyk Z.: Metodyka doświadczalnictwa zootechnicznego, PWRiL Warszawa 1955.
12. Semakov V. G., Babičeva L.: Dokl. VASChNIL. 6, 1967.

Леслав Кастыяк, Юзеф Лиминович, Изабелла Лоточко

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ КОРОВ НАХОДЯЩИХСЯ В РАЗНЫХ ПЕРИОДАХ ПОЛОВОГО ЦИКЛА НА ИНДЕКС ФРУКТОЛИЗА СЕМЕНИ БЫКОВ

Резюме

От коров находящихся в периоде течки, 8-10 и 18 дней после течки побрано кровь (из яремной вены), котурую после счущения центрофугировано при 3500

обротах/мин. в течении 10 минут. После центрифугирования сыворотку порционировано и консервировано в темп. -20°C . К исследованиям пробирку с сывороткой размороживано в водяной бане а темп. 37°C . К 0,3 мл только что полученного семени быков добавляно 0,1 мл буфорной смеси. Петерсена или 0,1 мл сывороток. Содержание фруктозы определяно методом Рое модифицированным через Манна. Полученные результаты указывают, что сыворотки крови происходящие от коров во-время течки, 8-10 и 18 дней после течки не имели статистически существенного влияния на процесс фруктолиза в семени быков—меньше того, самую большую убыль содержания фруктозы обнаружено при применении, как разбавителя — сыворотки крови, полученной от коров во-время течки, а самую малую — в буфорной смеси Петерсена.

Lesław Kastyak, Józef Liminowicz, Izabella Łotoczko

THE INFLUENCE OF BLOOD SERA IN COWS DURING DIFFERENT PERIODS OF SEX CYCLE, ON FRUCTOLISE INDEX OF BULL SEMEN

Summary

Blood samples gathered from the vein jugularis were taken from cows in heat period, 8-10 days and 18 days after heat. After coagulation the samples were centrifugated at 3500 rpm for 10 min. Then the serum was cut and stored at -20°C . The test tube was unfrozen in water bath at 37°C . 0.3 ml freshly obtained bull semen was supplemented by 0.1 ml of Petersen buffer or 0.1 ml of serum. The fructose content was estimated following Roe method modified by Mann. The obtained results show that: blood serum from cows in heat, 8-10 days and 18 days after heat had no statistically significant influence on the fructolise process in bull semen, but the major decrease in fructose content was found when blood serum from cows in heat was used as diluent and the minor in Petersen buffer.

*Doc. dr Lesław Kastyak
Instytut Genetyki i Metod Doskonalenia Zwierząt
Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie
Zakład Zoohigieny
Olsztyn-Kortowo*