

## BADANIA ZMIAN SKŁADNIKÓW BIAŁKOWYCH PLAZMY NASIENIA METODĄ PODWÓJNEJ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

*Zdzisław Boryczko*

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Katowicach

Kierownik: doc. dr hab. Antoni Furowicz

Podstawowymi składnikami plazmy nasienia buhaja są substancje białkowe, których wg Walesa i wsp. [cyt. za Mannem 7] jest około 7,0 g w 100 mililitrach. Skład białek plazmy nasienia jest zróżnicowany. Balbierz i wsp. [4] w rozdziale elektroforetycznym na żelu krochmalowym uzyskiwali do 17 frakcji w plazmie buhajów. Według Pernota i Szumowskiego [8] w plazmie nasienia jest 2,65 g<sup>0</sup>/o albumin, 74,4 *alfa*-globulin, 10,0 *beta*- i 2,57 g<sup>0</sup>/o *gamma*-globulin; są to podstawowe składniki białkowe.

Procesy chorobowe narządu rozrodczego powodują znaczne zmiany w spektrum białek plazmy nasienia, co uwidaczniają wyniki badań przeprowadzanych przez Balbierza i wsp. [1, 2, 3].

Zamierzeniem autora było określenie przydatności metody podwójnej dyfuzji w żelu agarowym do oceny zmian w składzie białek plazmy nasienia buhaja i ogiera.

### MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań była plazma nasienia 24 buhajów z Zakładu Unasienniania Zwierząt rasy ncb i nczb i 21 ogierów różnych ras. Wśród 24 buhajów 8 było z klinicznie zdrowym narządem rozrodczym, 9 — ze zmianami chorobowymi w różnych odcinkach narządu rozrodczego, powstałymi w warunkach naturalnych, oraz 7 — z doświadczalnie wywołanymi procesami zapalnymi pęcherzyków nasiennych lub jąder. W liczbie 21 badanych ogierów 14 było z klinicznie zdrowym narządem rozrodczym oraz dobrymi wskaźnikami jakościowymi nasienia, u 4 zaznaczyło się znaczne obniżenie parametrów jakościowych (bez klinicznie uchwytanych zmian w narządzie rozrodczym) oraz 3 — ze zmianami w narządzie rozrodczym.

Od buhajów i ogierów nasienie pobierano na sztuczną pochwę, (po dwa kolejne ejakulaty i niekiedy kilkakrotnie), następnie oddzielano plemniki od plazmy przez wirowanie, a w niektórych przypadkach i przez sączenie. Próbki plazmy nasienia ampułkowano i do czasu wykonania badań przechowywano w zamrażarce.

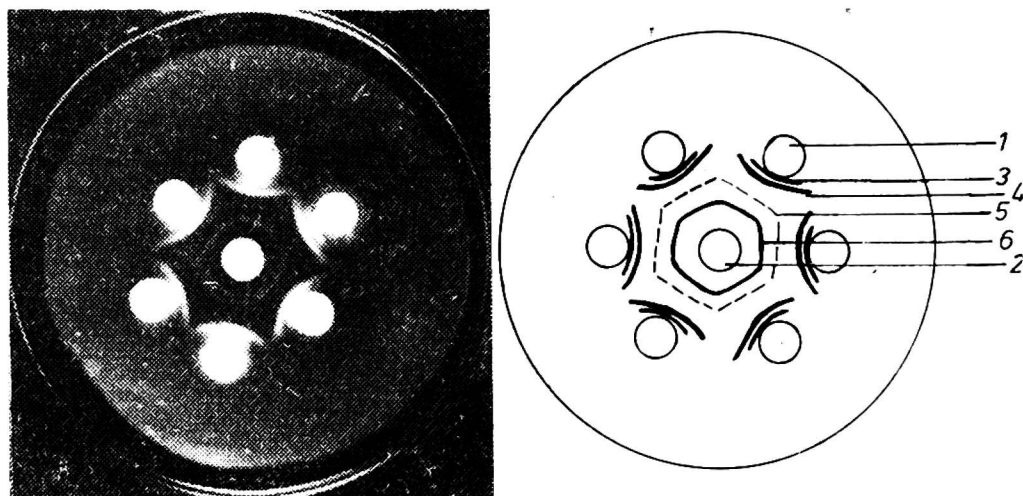
Plazmę nasienia, pochodzącą od buhajów i ogierów z klinicznie zdrowym narządem rozrodczym, użyto również do immunizacji królików w celu uzyskania immunosurowicy.

W badaniach zastosowano metodę podwójnej dyfuzji w żelu agarowym wg Ouchterlony w modyfikacji Stirma i wsp. [9]. Modyfikacja ta polegała na nakładaniu na płytkę agarową krążków bibułowych nasyconych badanym materiałem lub surowicą odpornościową (zamiast wycinania zbiorniczków). Niektóre dodatkowe szczegóły metodyczne zostały podane we wcześniejszej publikacji [6]. Odczyt płytek trwał przez 10 kolejnych dni.

Dodatkowo w próbkach plazmy nasienia badanych zwierząt oznaczono metodą biuretową poziom białka całkowitego.

#### WYNIKI

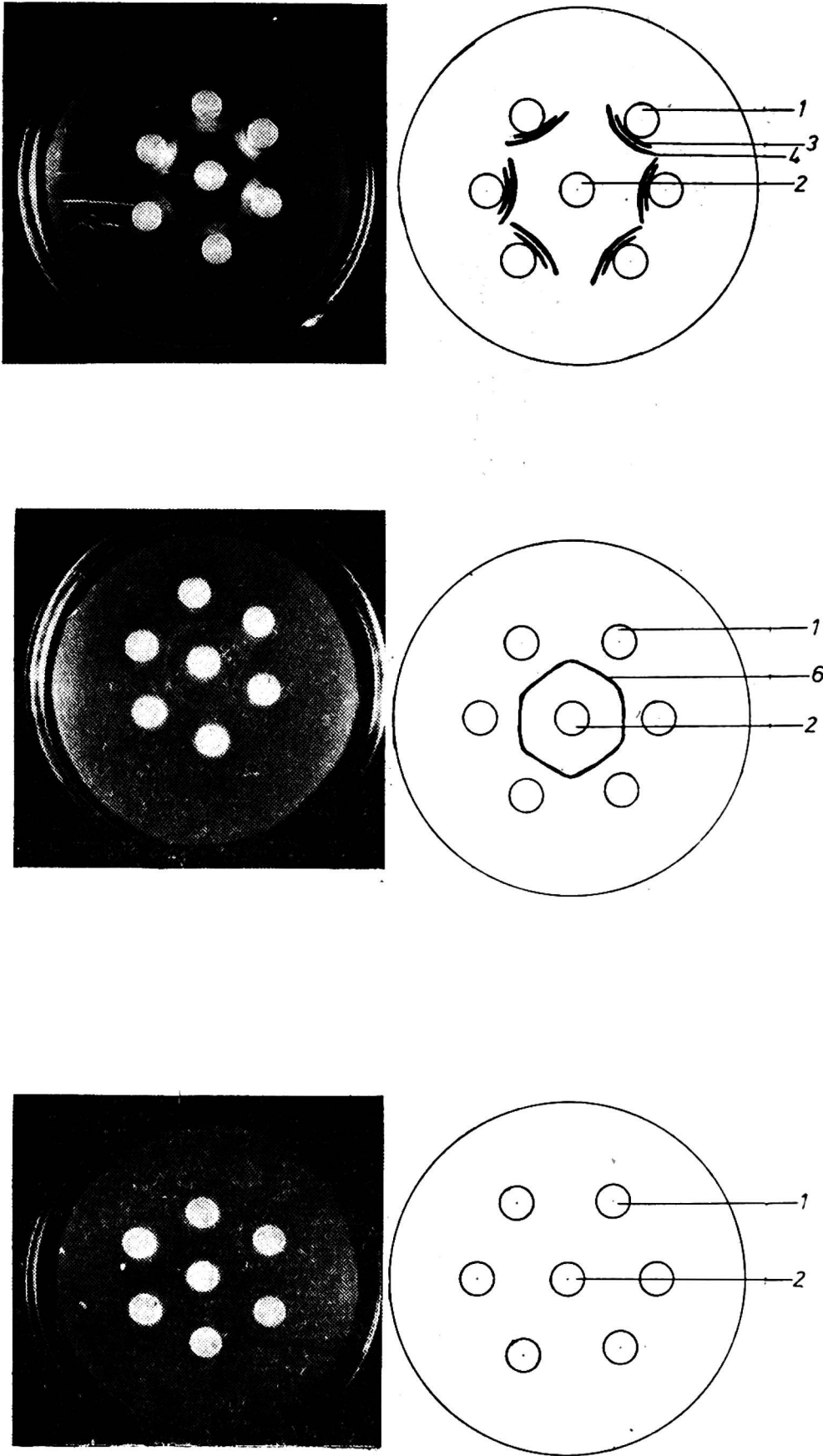
Plazma nasienia buhajów z klinicznie zdrowym narządem rozrodczym dawała w reakcji z immunosurowicą cztery linie precypitacyjne (rys. 1).



Rys. 1. Obraz podwójnej dyfuzji w żelu agarowym plazmy nasienia zdrowego buhaja: 1 — krążek nasycony immunosurowicą króliczą skierowaną przeciw plazmie nasienia buhaja, 2 — krążek nasycony plazmą nasienia, 3, 4, 5, 6 — łuki precypitacyjne

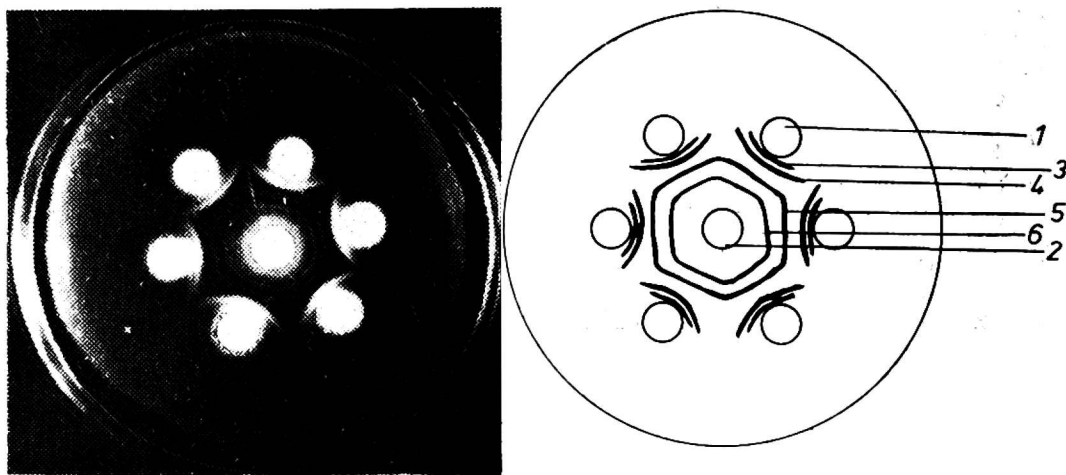
W przypadku, kiedy plazma pochodziła od buhajów, u których proces zapalny dotyczył pęcherzyków nasiennych, wówczas równolegle z natężeniem objawów chorobowych obserwowano zmniejszenie liczby linii precypitacyjnych, aż do zupełnego ich braku. Zmiany te obrazuje rysu-

nek 2. Proces zapalny jąder był również przyczyną zmian w składnikach białkowych plazmy nasienia, co w obrazie podwójnej dyfuzji odzwierciedlało się całkowitym zniknięciem lub wydatnym osłabieniem jednej



Rys. 2. Obrazy płytek z podwójną dyfuzją plazmy nasienia buhajów z procesami zapalnymi pęcherzyków nasiennych i innych odcinków narządu rozrodczego. Objasnienia jak w rysunku 1

z linii umiejscowionej w strefie środkowej płytki, a niekiedy pojawieniem się dodatkowych linii, których nie uwidacznia normalny obraz (rys. 3). Linie precypitacyjne najlepiej widoczne były w 2-4 dnia inkubacji (w przypadku plazmy nasienia buhaja). Dobra czytelność linii zachowywała się do 10 dni; dochodziło jedynie do rozmycia niektórych łuków.



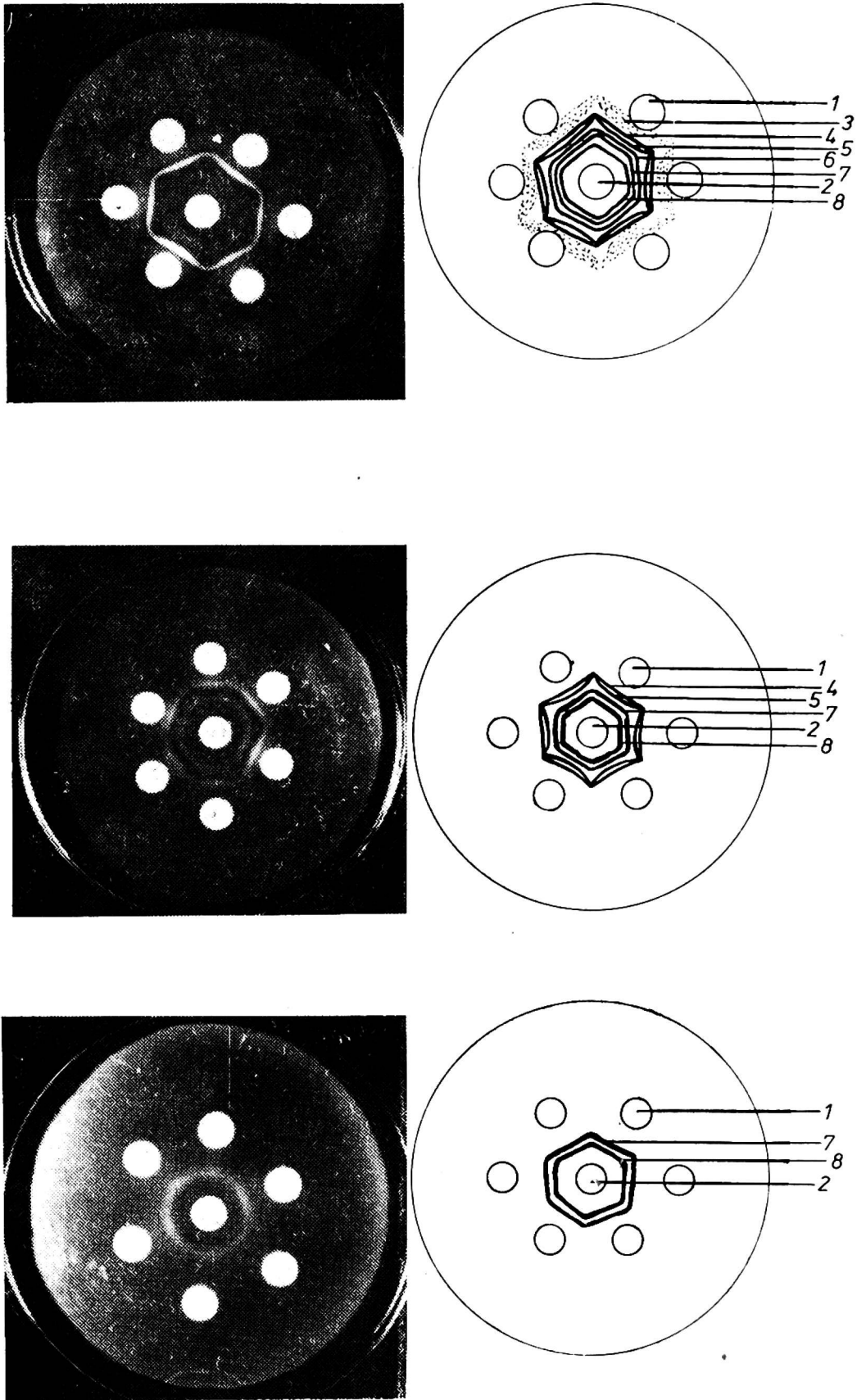
Rys. 3. Obraz podwójnej dyfuzji plazmy nasienia buhaja z procesem zapalnym jąder. Objaśnienia jak w rysunku 1

W podwójnej dyfuzji plazmy nasienia ogierów można było uzyskać do sześciu linii precypitacyjnych. Zmiany kliniczne w narządzie rozrodczym ogiera lub wydatne obniżenie wskaźników jakości nasienia ogierów nie korelowały w tych przypadkach wyraźnie z obrazem podwójnej dyfuzji, w którym obserwowano często niepełną liczbę łuków precypitacyjnych. Różne układy linii precypitacyjnych plazmy nasienia ogierów obrazuje rysunek 4. Odczytu płytek z podwójną dyfuzją plazmy nasienia ogierów dokonywano w 4-6 dnia po nastawieniu. W następnych dniach prawie całkowicie zanikał najbardziej obwodowo usadowiony najszerszy łuk precypitacyjny.

Tabela

Poziom białka w plazmie nasienia buhajów i ogierów

Wyszczególnienie	Buhaje z zapaleniem jąder	Buhaje z doświadczalnie wywołanym zapaleniem jąder	Buhaje z zapaleniem pęcherzyków nasiennych	Buhaje z doświadczalnie wywołanym zapaleniem pęcherzyków nasiennych	Buhaje kontrolne	Ogierzy
Liczba zwierząt	7	3	2	4	8	21
Poziom białka w g %	6,71 4,57—9,19	6,46 4,93—7,95	1,60 1,60	2,87 0,36—7,49	6,25 5,15—8,29	1,22 0,33—3,24



Rys. 4. Obrazy podwójnej dyfuzji w żelu agarowym plazmy nasienia ogiera: 1 — krążek nasycony immunosurowicą króliczą skierowaną przeciw plazmie nasienia ogiera, 2 — krążek nasycony plazmą nasienia ogiera, 3, 4, 5, 6, 7, 8 — łuki precipitacyjne



Między buhajami z zapaleniem pęcherzyków nasiennych a pozostałymi były znaczne różnice w poziomie białka plazmy nasienia. Ilustruje to tabela, w której ujęto również wyniki oznaczeń poziomu tego składnika u ogierów.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Metoda podwójnej dyfuzji w żelu agarowym w przyjętych warunkach daje możliwość wykazania w plazmie nasienia buhajów czterech łuków precypitacyjnych. Analogiczną liczbę łuków dla plazmy nasienia buhajów z normospermia uzyskał w podwójnej dyfuzji Strzeżek i wsp. [10]. Można sądzić, że łuki te łączą się z obecnością w plazmie buhaja immunogennych białek, którymi wg Pernot i Szumowskiego [8] są głównie albuminy, *alfa*-, *beta*- i *gamma*-globuliny.

W przypadkach procesów zapalnych pęcherzyków nasiennych, ewentualnie innych gruczołów dodatkowych oraz pozostałych odcinków wydzielniczych narządu rozrodczego buhajów, dochodzi do zmian w stosunkach ilościowych frakcji białkowych plazmy [1, 2, 10, 11], co przypuszczalnie znajduje swoje odzwierciedlenie w różnym obrazie podwójnej dyfuzji. Również globalny poziom białka plazmy nasienia buhaja ulega wybitnemu zmniejszeniu w procesach zapalnych, w których objęte są tym stanem pęcherzyki nasienne. Według Bloma [5] zawartość składników oznaczonych refraktometrycznie w nasieniu buhajów, u których stwierdzono zapalenie pęcherzyków nasiennych na tle zakażenia *Corynebacterium pyogenes*, wahała się w granicach 2,0-2,6 g<sup>0</sup>/o.

Brak wyraźnej zależności między liczbą łuków precypitacyjnych a stanem klinicznym narządu rozrodczego ogiera (lub wskaźnikami jakości nasienia) można tłumaczyć bardziej skomplikowanym — niż u innych gatunków — mechanizmem ejakulacji, który może być powodem występowania niepełnych ejakulatów. Niemniej należy zaznaczyć, że u żadnego z ogierów ze zmianami klinicznymi w narządzie rozrodczym oraz wybitnie obniżonymi wskaźnikami jakościowymi nasienia nie obserwowano większej liczby łuków precypitacyjnych niż 2-3, natomiast u ogierów klinicznie zdrowych, z dobrymi wskaźnikami jakościowymi nasienia, od 2 do 6.

#### WNIOSKI

1. Metoda zmodyfikowanej podwójnej dyfuzji może znaleźć zastosowanie we wstępnej orientacyjnej ocenie zmian w spektrum białek plazmy nasienia buhajów i ogierów.

## PIŚMIENNICTWO

1. Balbierz H., Boryczko Z., Nikolaiczuk M.: Pol. Arch. wet. 16, 3, 497, 1973.
2. Balbierz H., Boryczko Z., Nikolaiczuk M.: Pol. Arch. wet. 16, 4, 601, 1973.
3. Balbierz H., Nikolaiczuk M.: Arch. Immun. Ther., 18, 537, 1970.
4. Balbierz H., Nikolaiczuk M., Senze A., Stehlik Z.: Pol. Arch. wet. 14, 1, 99, 1971.
5. Blom E.: Andrologie, 1, (2), 71, 1969.
6. Boryczko Z., Czapla K., Furowicz A.: Medycyna Wet., 28, 349, 1972.
7. Mann T.: Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. Methuen, London 1964.
8. Pernot E., Szumowski P.: Bull. Soc. Chim. biol., 40, 11, 1423, 1958.
9. Stirm S., Ørskov F., Ørskov I. and Mansa B.: J. Bact., 93, 2, 731, 1967.
10. Strzeżek J., Liminowicz J., Rotkiewicz T.: Medycyna Wet., 29, 553, 1973.
11. Strzeżek J., Rotkiewicz T., Liminowicz J.: Medycyna Wet., 29, 479, 1973.

*Здзислав Борычко*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ  
В СОСТАВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ БЕЛКА ПЛАЗМЫ СЕМЕНИ  
ПО МЕТОДУ ДВОЙНОЙ ДИФФУЗИИ В АГАРОВОМ ЖЕЛЕ**

**Резюме**

В труде делается попытка определения пригодности для исследования по методу двойной диффузии в агаровом желе изменений происходящих в составных элементах белка плазмы семени быков и жеребцов с патологическими процессами полового органа. Полученные результаты позволяют заключать, что указанный метод может находить применение в предварительной оценке изменений в среде белков плазмы семени. Это в частности касалось быка, у которого воспаление добавочных половых желез и других частей полового органа вызвало значительные изменения в составных элементах белка плазмы семени. Это нашло свое отражение в картине двойной диффузии в уменьшенном числе или полном отсутствии преципитационных линий.

*Zdzisław Boryczko*

**INVESTIGATION ON CHANGES IN PROTEIN COMPONENTS OF THE SEMEN  
PLASMA BY THE METHOD OF DOUBLE DIFFUSION IN THE AGAR GEL**

**S u m m a r y**

In the work an attempt is made to determine, if the changes occurring in protein components of the semen plasma of bulls and stallions with pathologic process of the sexual organ were useful for investigation by the method of double diffusion in the agar gel. The results obtained allow to conclude that the method mentioned could be applied in a preliminary estimation of changes in the medium of semen plasma proteins. It concerned particularly a bull, in which the inflamma-

tion of additional sexual glands and other reproduction organ parts caused considerable changes in semen plasma protein components. In the picture of the double diffusion it finds its reflection in a less number or in a total lack of precipitation lines.

*Dr Zdzisław Boryczko*  
*Zakład Higieny Weterynaryjnej*  
*Pracownia Fizjologii i Patologii Rozrodu*  
*40-585 Katowice, ul. Brynowska 25a*