

BADANIA NAD AKTYWNOŚCIĄ DNazy KWAŚNEJ W PLEMNIKACH CZŁOWIEKA

K. MIĘTKIEWSKI, A. LUKASZYK, T. RUCKI

Z Zakładu Histologii Prawidłowej i Embriologii AM w Poznaniu

Kierownik: prof. dr med. K. Miętkiewski

Z I Kliniki Położnictwa i Chorób Kobietych AM w Poznaniu

Kierownik: prof. dr med. W. Michałkiewicz

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie DNazy II w szeregu badanych tkanek związane jest z lizosomami oraz częściowo z jądrem komórkowym. Na tego rodzaju lokalizację aktywności kwaśnej DNazy wskazują wyniki badań przeprowadzonych przy pomocy metod biochemicznych (4), jak również prace histochemiczne głównie V o r b r o d t a i wsp. (8). Zdaniem B r o w n a i wsp. (3) oraz A l l f r e y ' a i M i r s k y ' e g o (1) jądra komórkowe w grasicy, śledzionie, wątrobie, nerce i mięśniu sercowym zawierają średnio około 20% całkowitej aktywności DNazy II komórki.

Celem przedstawianego doniesienia jest prześledzenie rozmieszczenia aktywności DNazy II w plemnikach człowieka i zachowania się odczynu w zależności od pH środowiska inkubacyjnego, zmian w jego składzie, rodzaju użytego utrwalacza i wreszcie od takich czynników jak zamrażanie i odmrażanie.

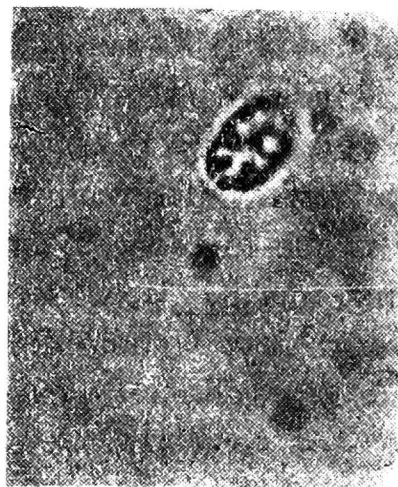
Do podjęcia tych badań skłoniła nas między innymi morfologiczno-czynnościowa odrębność plemników w stosunku do komórek somatycznych. Jak wiadomo zasadniczą rolą biologiczną plemników jest przeniesienie do komórki jajowej haploidalnego garnituru chromosomów. Istotą natomiast przemian biochemicznych zachodzących w samych plemnikach jak i w plazmie nasienia jest głównie synteza wysokoenergetycznych połączeń fosforowych (ATP) potrzebnych dla podtrzymania ich ruchu i zachowania życia.

Przypuszczamy więc, że nie należy się raczej spodziewać występowania lizosomów w plemnikach tym bardziej, że nie wskazują na to badania przy użyciu mikroskopu elektronowego (5). Ponadto zakładamy, że plemniki pozbawione są endogennej kwaśnej fosfatazy, jakkolwiek Wisłocki wykazał jej aktywność na rozmazach utrwalonych acetonem (9). Niezależnie od tego wyniku badań zagadnienie to jest nadal dyskutowane. Jak zostało wykazane plazma nasienia przejawia wysoką aktywność kwaśnej fosfatazy. Według Manna zaś przepuszczalność otoczki plemnika jest tak duża, że umożliwia przenikanie w obydwu kierunkach białek rozpuszczalnych nawet o wysokim ciężarze drobinowym (6). Należy tu dodać, że na rozmazach, które przygotowaliśmy do wykrycia DNazy II, nie udało się wykazać aktywności kwaśnej fosfatazy. Wobec powyższego wydaje się prawdopodobne, że w przypadku badanych przez nas plemników człowieka można w zasadzie nie brać pod uwagę ewentualności wystąpienia nieswoistego odczynu spowodowanego czynnością endogennej kwaśnej fosfatazy, który zdaniem Vorbrodta komplikuje wynik reakcji na DNazę II.

Badania przeprowadzono na rozmazach nasienia uzyskanego od 18 zdrowych mężczyzn z normospermia zgłaszających się do Poradni Andrologicznej przy I Klinice Położnictwa i Chorób Kobietych AM w Poznaniu



Rys. 1. Odczyn na kwaśną DNazę w główce plemników. Rozmaz utrwalono w oziębionym formolu-Ca przez 24 godz. i inkubowano w płynie o pH 5,0 przez 3 godz.



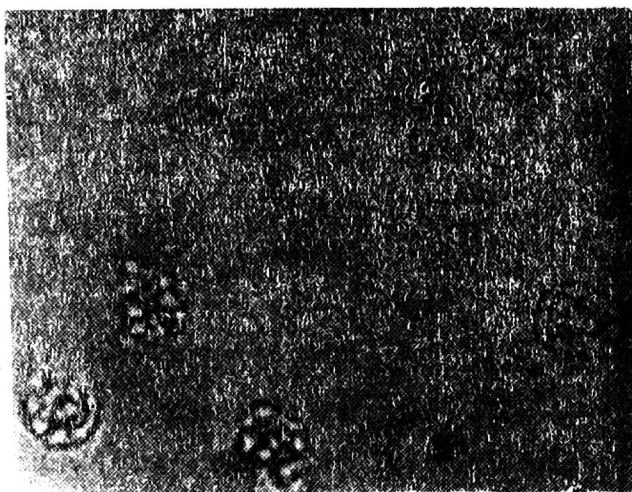
Rys. 2. Kwaśna DNaza w główce plemnika. Utrwalenie jak na rysunku 1. Inkubacja w środowisku o pH 5,2

z powodu niepłodności w małżeństwie. Rozmazy utrwalano w oziębionym, obojętnym formolu-Ca przez 8 godzin, 24 godz., a niekiedy kilka dni oraz w zimnym bezwodnym acetonie przez okres 3 godzin.

Preparaty inkubowano przez okres 2,5—3 godz. w płynach o pH 5,0, 5,2, 5,4, 5,6 i 5,9 przygotowanych według przepisu Vorbrodta (8). Jako substratu używano nisko spolimeryzowanego DNA produkcji Lighta.

Wyniki i ich omówienie

Na rozmazach utrwalonych w formolu-Ca, niezależnie od stosowanego czasu utrwalania i pH płynu inkubacyjnego, odczyn na kwasną DNazę



Rys. 3. Rozmaz poddany kilkakrotnemu zamrażaniu i odmrażaniu w środowisku wodnym. Preparat inkubowany w płynie o pH 5,2



Rys. 4. Ziarnisty charakter odczynu na DNazę II w jądrze i akrosomie główki plemnika po inkubacji rozmazów przy pH 5,9

zlokalizowany jest w główce plemnika. Po inkubacji przy pH 5,0 spostrzega się złogi siarczku ołowiu w osłonce główki plemnika, w jądrze czyli w miejscu występowania DNA oraz nieliczne i drobne w akrosomie. W jądrze ten odczyn występuje w postaci przestrzennej siateczki jak gdyby oddzielającej fragmenty chromatyny, które wydają się odpowiadać chromosomom (rys. 1).

Podobnie reakcja ta przebiega w plemnikach po inkubacji w pH 5,2 i 5,4 (rys. 2). Preparaty inkubowane w pH 5,9 wykazują odczyn ziarnisty, występujący w obrębie jądra plemnika, a drobnoziarnisty w akrosomie (rys. 4).

Zamrażanie i wtórne odmrażanie powoduje zmniejszanie się rozmiarów ziaren będących wykładnikiem aktywności badanego odczynu. W tych warunkach DNaza występuje w postaci miernej wielkości ziaren niezależnie od pH płynu inkubacyjnego (rys. 3 i 5).



Rys. 5. Preparat traktowany jak na rys. 3 i inkubowany przy pH 5,9

Na rozmazach nasienia utrwalonych acetonem i po inkubacji w pH 5,2 odczyn na omówiony enzym rozmieszczony jest w postaci dyfuzyjnej w jądrze i witce plemnika (rys. 6). W pH 5,4—5,9 natomiast barwią się tylko główki plemników. Dodanie do płynu inkubacyjnego $MgCl_2$ w stę-

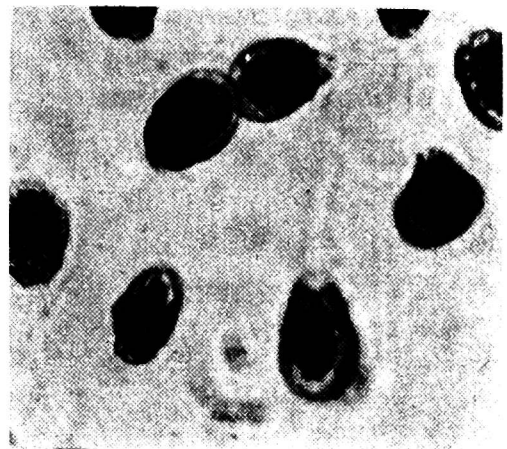
żeniu 0,001 M nie wywiera wpływu na wynik reakcji. Po wprowadzeniu do środowiska inkubacyjnego soli sodowej EDTA w stężeniu 0,001 M na preparatach inkubowanych w pH 5,9 charakter odczynu odpowiada wynikom uzyskanym po inkubacji w płynach pH 5,0 i 5,2 bez dodatku wersenianu. Dodawanie wersenianu natomiast do płynów o pH 5,0 i 5,2 powodowało brak odczynu. Pozytywnej reakcji na DNazę kwaśną nie

wykazano również na rozmazach inkubowanych bez substratu oraz w płynach sporządzonych z pominięciem kwaśnej fosfatazy.

Jak z przedstawionych spostrzeżeń wynika, charakter odczynu histochemicznego na aktywność DNazy kwa-



Rys. 6. Odczyn na aktywność kwaśnej DNazy zlokalizowanej w główce i witce plemnika. Preparat utrwalano acetonem w czasie 3 godz. i inkubowano w środowisku o pH 5,2 przez okres 3 godz.



Rys. 7. Aktywność kwaśnej DNazy zlokalizowana w główce plemników w rozmazach utrwalanych w ciągu 3 godz. acetonem i inkubowanych w płynie o pH 5,6

śnej w plemnikach zależy od szeregu czynników. Niezależnie jednak od użytego utrwalacza i pH płynu inkubacyjnego reakcja lokalizuje się w główce plemnika (w jądrze i akrosomie). Niejasne natomiast jest pojawienie się odczynu na DNazę II w witce plemnika po utrwaleniu rozmazów w acetonie i inkubacji w płynie o pH 5,2. Najbardziej jednak godne uwagi jest naszym zdaniem występowanie aktywności DNazy II w jądrze plemników i to — jak można sądzić — pomiędzy fragmentami chromatydy. Swingle i Cole (7) zastanawiają się, czy DNaza II zawarta w jądrach komórkowych jest identyczna z DNazą lizosomów i stoją na stanowisku, że zagadnienie to wymaga dalszych wnikliwych badań. Zdaniem Bolluma (2) DNaza kwaśna w jądrach uczestniczy w procesie podziału komór-

kowego poprzez aktywację komórkowego DNA w kierunku „primera“ dla czynności DNA-polimerazy, która katalizuje proces dołączania nukleotydów do łańcucha polinukleotydowego. Autor ten podkreśla, że czynność DNazy II może spowodować odwrócenie „natywnej“ formy DNA w postaci „primera“. W takim ujęciu obecna w jądrze plemników kwaśna DNaza odgrywałaby wzmiankowaną wyżej rolę dopiero po zapłodnieniu komórki jajowej, tj. w zygocie zdolnej do podziału. Należałoby jednak wziąć pod uwagę jeszcze inną ewentualność. Mianowicie lokalizacja aktywności badanego enzymu pomiędzy fragmentami chromatyny jak też jej obecność w osłonce jądra nasuwać może przypuszczenie o istnieniu aparatu ochronnego, który mógłby przeciwdziałać wnikaniu obcogatunkowego DNA do wnętrza główki plemnika.

Różnice zaś w zakresie charakteru odczynu i wielkość zlogów, zależne od utrwalacza, naprzemiennego zamrażania i odmrażania oraz pH środowiska inkubacyjnego spowodowane są przypuszczalnie zmianami warunków fizykochemicznych w przebiegu reakcji ujawniających w plemnikach czynność DNazy II.

PIŚMIENNICTWO

1. Allfrey V., Mirsky A. E. (1952): J. Gen. Physiol. 36, 227.
2. Bollum F. J. (1963): „Primer“ in DNA polymerase reaction. W: Progress in nucleic acid research. Acad. Press. N. York.
3. Brown D. K., Jakobs G., Laskowski M (1952): J. Biol. Chem. 194, 445.
4. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wiattaux B., Appelmann F. (1955): Biochem. J. 60, 604.
5. Fawcett D. N. (1958): Int. Rev. Cytol. 7, 195.
6. Mann T. (1958): Biochemia nasienia PWRL, Warszawa.
7. Swingle K. F., Cole F. J. (1964): J. Histochem. Cytochem. 12, 442.
8. Vorbrodt A. (1961): J. Histochem. Cytochem. 9, 647.
9. Wisłocki G. B. (1950): Anat. Rec. 108, 645.

К. Менткевски, А. Лукашик, Т. Ручки

ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ КИСЛОЙ ДНАзы II В МУЖСКОЙ СЕМЕННОЙ КЛЕТКЕ

Резюме

Авторы провели исследования по содержанию ДНАзы II в мужских семенных клетках, полученных из спермы здоровых мужчин при помощи гистохимического метода.

На основании сделанных выводов, рассматривается предполагаемое значение ДНАзы II в головках мужской семенной клетки.

K. Miętkiewski, A. Łukaszyk, T. Rucki

INVESTIGATIONS ON THE ACID DNase ACTIVITY
IN HUMAN SPERMATOOZOA

Summary

Investigations on the acid DNase activity by means of smear in the human spermatozoa obtained from healthy men were performed. Some changes of localication and character in the histochemic reaction as a result of different incubating medium, variety of the pH incubating solution and its freezing and refreezing were observed. Short interpretation of the results and some suggestions concerning biological role of the DNaze in the spermatozoa nucleus are discussed.