

## WSTĘPNA IDENTYFIKACJA FRAKCJI BIAŁKOWYCH PLAZMY NASIENIA UZYSKIWANYCH Z POSZCZEGÓLNYCH ODCINKÓW WYDZIELNICZYCH NARZĄDU ROZRODCZEGO BUHAJA

*Henryk Balbierz, Zdzisław Boryczko,  
Maria Nikołajczuk, Marian Tischner*

Zakład Immunopatologii i Immunogenetyki  
Instytutu Patologii i Terapii Zwierząt,  
Wydział Weterynaryjny we Wrocławiu  
Kierownik: prof. dr hab. Henryk Balbierz

Instytut Patologii i Terapii Zwierząt AR we Wrocławiu  
Dyrektor: prof. dr hab. Ryszard Badura

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Katowicach  
Kierownik: doc. dr hab. Antoni Furowicz

Instytut Stosowanej Fizjologii Zwierząt AR w Krakowie  
Dyrektor: prof. dr hab. Władysław Bielański

W poprzednich pracach [1, 2] wysuwaliśmy sugestie, że odniesienie stref elektroforetycznych z żelu krochmalowego oraz łuków precypitacyjnych w obrazie immunoelektroforezy (AIE) do poszczególnych odcinków męskiego narządu rozrodczego mogłoby ułatwić interpretację zmian obserwowanych w składzie frakcji białkowych pełnej plazmy nasienia buhajów. Zagadnienie to omawiano w niniejszej publikacji.

### MATERIAŁ I METODYKA

Badania przeprowadzono na plazmie nasienia pochodzącego od 4 buhajów rasy ncb w wieku od 7-12 lat. U dwóch z tych buhajów po pobraniu kontrolnych ejakulatów podwiązano oba nasieniowody, u dwóch pozostałych — podwiązano tylko nasieniowody lewe, natomiast do prawych wprowadzono operacyjnie cewniki polietylenowe metodą opisaną przez Bielańskiego i Ewy [5, 7] w modyfikacji opracowanej przez Tischnera [12]. Łącznie od buhajów (buhaje pozostawały w doświadczeniu od 18 do 31 dni) pobrano 30 pierwszych i 23 drugich ejakulatów. Materiałem, prócz plazmy nasienia uzyskiwanej po wirowaniu ejakulatów pobieranych na sztuczną pochwę, była również część składowa plazmy nasienia, którą uzyskiwano z przetok nasieniowodów, także uwolniona od plemników.

Materiał z przetok nasieniowodów pobierano codziennie, zmieniając próbki podwieszane do cewnika polietylenowego. Wydzielinę z przetoki nasieniowodu badano w trzecim, czwartym, dziewiątym i siedemnastym dniu od założenia przetoki u buhaja pierwszego oraz w szóstym, siódmym i dwunastym od dnia założenia przetoki u buhaja drugiego. Odwirowaną plazmę nasienia oraz wydzielinę z przetok nasieniowodów przechowywano do czasu badania w zamrażarce w temp. około  $-23^{\circ}\text{C}$ .

Plazmę nasienia i wydzielinę z przetok badano metodą rozdziału elektroforetycznego w żelu krochmalowym, wg techniki podanej przez Balbierza i wsp. [4], używając jako barwnika — czerni amidowej 10B.

Analizę immunoelektroforetyczną (AIE) wybranych próbek plazmy nasienia oraz wydzieliny uzyskanej z przetok przeprowadzono wg Grabara i Burtin [8] na szkiełkach podstawowych, stosując dwie, uzyskane we własnym zakresie, królicze surowice odpornościowe: 1) przeciw plazmie nasienia buhaja (anty-PSB) oraz 2) przeciw surowicy bydłowej (anty-SNB). Immunoelektroforegramy wybarwiono czerwienią pasową oraz w analogicznych preparatach określano linie aktywności enzymatycznej esterazy karboksylowej i zasadowej fosfatazy.

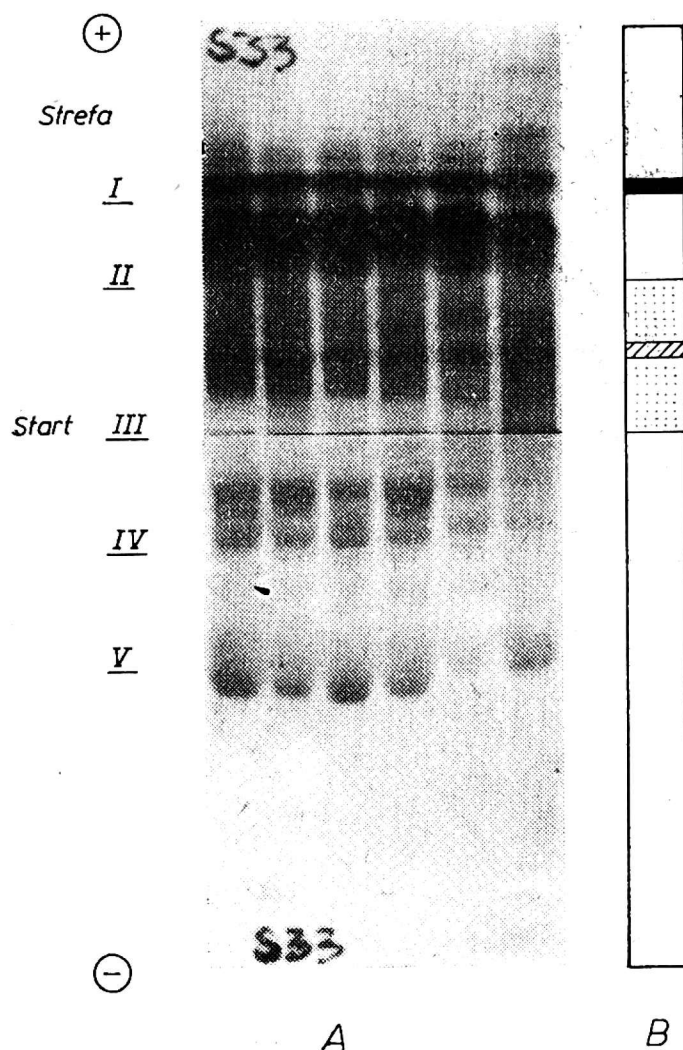
Podwójną dyfuzję w żelu agarowym wg Ouchterlony wykonywano w modyfikacji do nasienia, opracowanej przez Boryczkę i wsp. [6].

## WYNIKI

Obraz rozdziału elektroforetycznego plazmy nasienia buhajów z podwiązanymi lub przetokowanymi nasieniowodami, uzyskanej z pobierań na sztuczną pochwę, ujawnił od 12 do 17 frakcji skupionych w 5 umownych strefach. W pierwszych trzech strefach niezmienny obraz frakcji utrzymywał się przez cały ciąg obserwacji; był podobny dla wszystkich próbek uzyskanych od czterech badanych buhajów. Różnice wystąpiły we frakcjach IV i V, i zarysowały się w rozdziale próbek pobieranych zarówno od buhajów z założonymi przetokami nasieniowodu, jak również z podwiązanymi nasieniowodami. W strefach tych obserwowano osłabienie lub całkowity zanik frakcji.

Inny obraz, różny od poprzedniego, przedstawiały elektroforegramy próbek plazmy nasienia uzyskane z przetoki nasieniowodu. W elektroforegramach tych w strefie I widoczna była jedynie frakcja odpowiadająca albuminom, brakowało natomiast drobnych frakcji doanodowych. Całkowity brak frakcji ujawnił się w strefie II, w której z pełnej plazmy nasienia można było wyróżnić w elektroforegramie do 4 frakcji najmocniejszych (w całości obrazu). Frakcje strefy III w wydzielinie zebranej z przetoki nasieniowodów były obecne, aczkolwiek słabiej zaznaczone. W próbkach wydzieliny zbieranej z najądrzy i z jąder (z przetok) od obu

buhajów brakowało frakcji skupionych w strefie IV i V. Należy jednak zaznaczyć, że pełna plazma nasienia jednego z przetokowanych buhajów przez cały okres obserwacji nie zawierała tych frakcji. Różnice w liczebności frakcji białkowych plazmy nasienia (uzyskanej z pobierań na sztuczną pochwę oraz z przetok nasieniowodów) ujawnione w elektroforegramach obrazuje rysunek 1.

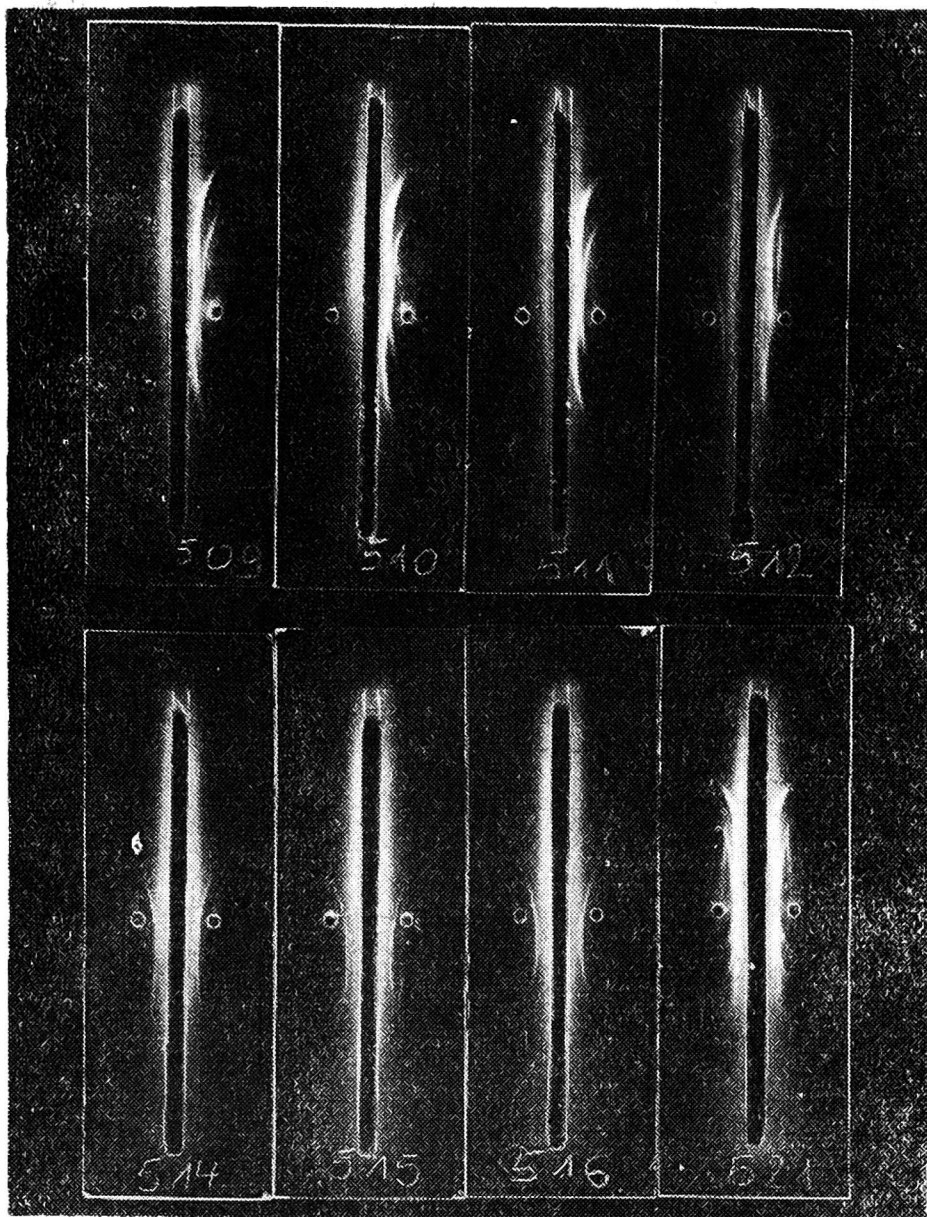


Rys. 1. A — elektroforegram pełnej plazmy nasienia buhajów, B — schemat elektroforegramu wydzieliny zebranej z przetoki nasieniowodu

W plazmie pochodzącej z pobierań na sztuczną pochwę wykazano metodą immunoelektroforezy (AIE) obecność do 8 łuków. Liczba tych łuków oraz ich umiejscowienie były podobne do obrazów AIE z materiałów pobranych przed i po podwiązaniu nasieniowodów lub po założeniu przetoki. Obraz ten w zasadzie nie zmieniał się przez cały okres obserwacji.

Znaczną ubogość ujawnił obraz AIE wydzieliny z przetok nasieniowodów.

Zestawienie obrazów AIE na rysunku 2 wskazuje, że układ linii precypitacyjnych wydzieliny przetoki nasieniowodu buhaja pierwszego upodobnił się w siedemnastym dniu po założeniu przetoki do obrazu wydzieliny buhaja drugiego. Natomiast w dniach poprzednich cechował się



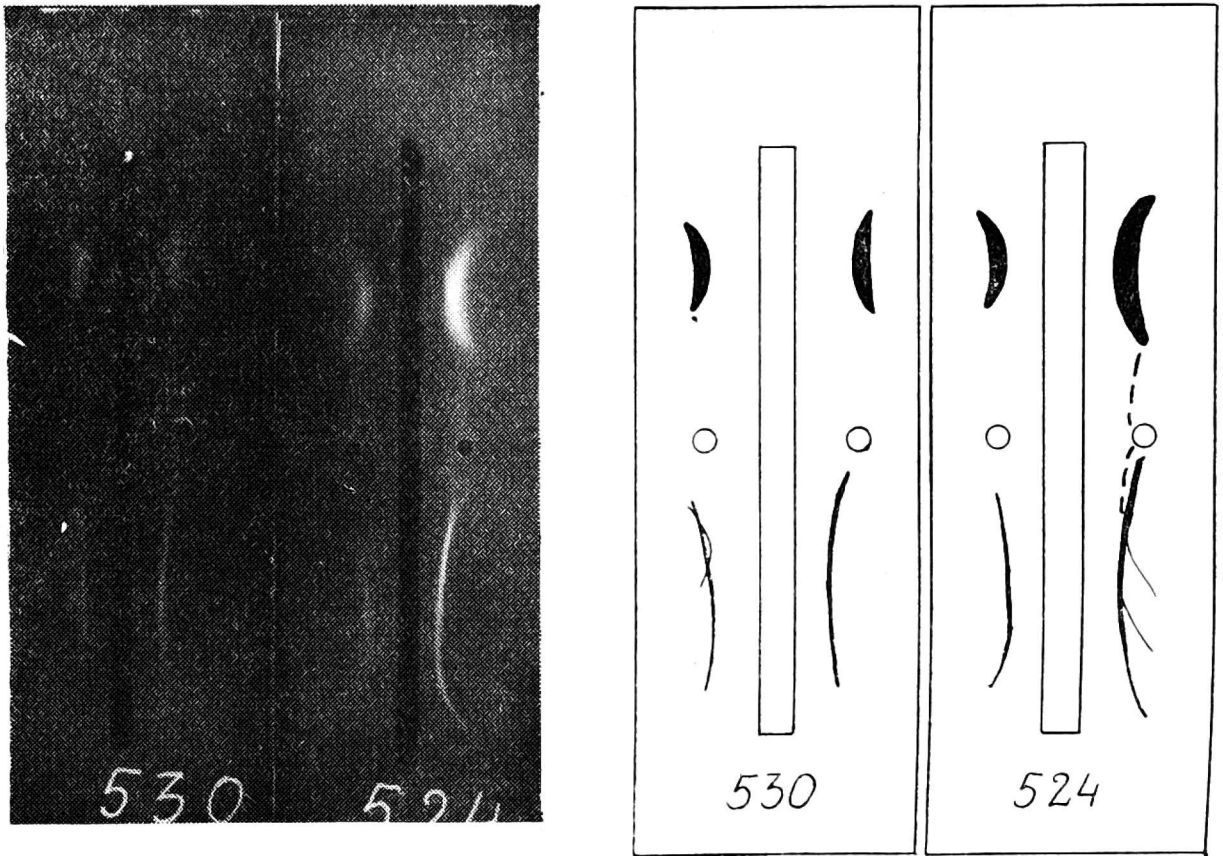
Rys. 2. Obraz AIE wydzieliny z przetoki nasieniowodu i plazmy nasienia buhaja pierwszego i drugiego uzyskany z surowicą anti-PSB. Ciąg górny — po lewej wydzielina z przetoki, po prawej plazma nasienia buhaja pierwszego. Ciąg dolny — trzy preparaty od lewej — obustronnie wydzielina z przetoki nasieniowodu, czwarty preparat — obustronnie plazma nasienia buhaja drugiego

brakiem linii dodatkowej oraz obecnością linii słabych po stronie doanodowej, wykazujących, w miarę upływu czasu, tendencje znikania. Analogiczne wyniki uzyskano metodą podwójnej dyfuzji w żelu agarowym.

Z surowicą anti-SNB zarówno wydzielina przetoki, jak i plazma użykana do sztucznej pochwy, wykazały w obrazie AIE linie precypitacyjne w rejonie albumin oraz w rejonie o migracji *gamma*. Ta linia u bu-

haja pierwszego wykazuje w siedemnastym dniu trwania przetoki dwie ostrogi różnicowania antygenowego (rys. 3).

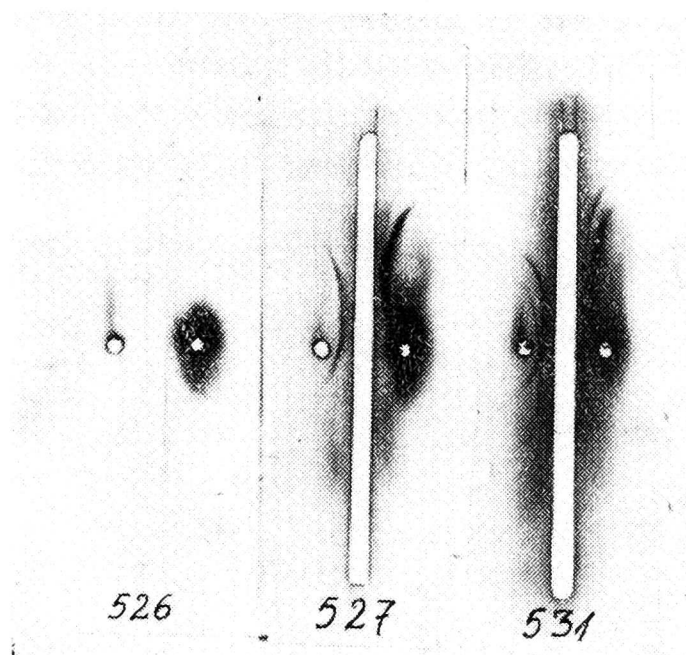
Metoda podwójnej dyfuzji w żelu agarowym uwidoczniała w wydzielinie z przetoki i plazmie trzy linie precypitacyjne z surowicą anti-SNB.



Rys. 3. Obraz AIE — nie barwiony — wydzieliny przetoki i plazmy nasienia wywołany surowicą anti-SNB. Preparat 530 — po stronie lewej wydzielina przetoki buhaja drugiego, po prawej plazma nasienia tegoż buhaja pobrana w tym samym czasie. Preparat 524 — po lewej wydzielina przetoki w 3 dniu, po prawej w 17 dniu po założeniu przetoki u buhaja pierwszego

Hydroliza *beta*-naftylofosforanu sodu przez fosfatazę zasadową zaznaczyła się w wydzielinie z przetoki w formie rozmytego welonu, zwróconego w kierunku anody, oraz w plazmie ejakulatu w formie mocnej plamy, obejmującej dołek startowy; nie utworzyły się jednak typowe linie precypitacyjne.

Wydzielina z przetoki nasieniowodu zawierała również frakcję posiadającą aktywność esterazy hydrolizującej octan *alfa*-naftyłu. W immunoelektroforegramie linia ta opasuje dołek startowy w formie typowego łuku precypitacyjnego, a inna — znacznie słabsza i krótsza — jest widoczna po dokatodowej stronie dołka startowego. W plazmie ejakulatu linia aktywności jest wydłużona w kierunku anody i biegnie wzdłuż rowka z immunosurowicą; po wewnętrznej stronie łuku barwiącego się czernią amidową (rys. 4).



Rys. 4. Ustalenie linii precypitacyjnych wykazujących aktywność enzymatyczną w AIE: preparat 526 — aktywność fosfatazy zasadowej, preparat 527 — aktywność esterazy karboksylowej, preparat 531 — po wywołaniu aktywności esterazy karboksylowej zabarwiony dodatkowo czernią amidową. W preparatach po stronie lewej wydzielina z przetoki, po stronie prawej plazma nasienia buhaja pierwszego

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Obraz rozdziału elektroforetycznego w żelu skrobiowym próbek plazmy nasienia, pobranej na sztuczną pochwę przed i po podwiązaniu nasieniowodów lub kaniulacji, nie uwidoczniał różnic w ilości i umiejscowieniu poszczególnych frakcji białkowych. Obraz ten jest w pełni porównywalny z uzyskanym w poprzednich naszych badaniach [1, 2, 4]. Świadczyć by to mogło, że plazma nasienia zbierana z odcinków wydzielniczych powyżej najądrzy zawiera frakcje pełnej plazmy. Zaznaczyć jednak należy, że badania nasze wykonane zostały na czterech buhajach i wymagają dalszego rozszerzenia.

Elektroforegramy wydzieliny pobranej z przetok nasieniowodów różniły się znacznie od elektroforegramów pełnej plazmy nasienia brakiem niektórych frakcji w strefie I oraz całkowitym brakiem strefy II, która w elektroforegramie pełnej plazmy jest najmocniejsza. Opisane wyżej cechy były wspólne dla elektroforegramów obu przetokowanych buhajów. Według Pernot i Szumowskiego [10], którzy prowadzili rozdział plazmy nasienia na bibule, najwyraźniejsza była frakcja *alfa*-globulin.

Na podstawie powyższego można przypuszczać, że zmiany opisane przez Balbierza i wsp. [1, 2, 4] oraz Strzeżka i wsp. [11] mogą być następstwem nie tylko upośledzenia funkcji gruczołów, wywołanego procesem chorobowym, ale również rozregulowania nadrzędnej funkcji sterującej, sprawowanej przez jądra w stosunku do dodatkowych gruczołów wydzielniczych narządu rozrodczego.

Trudne do interpretacji są najbardziej labilne zmiany obserwowane w strefach IV i V. Frakcje plazmy nasienia, zlokalizowane w tych strefach, nie mają odpowiedników w elektroforegramach surowicy krwi. U jednego z buhajów frakcje tych stref były obecne w plazmie nasienia pobieranego na sztuczną pochwę przez cały okres badań, gdy tymczasem obserwowano ich brak w wydzielinie zebranej z przetoki nasieniowodu.

Rekapituluując wyniki uzyskane w AIE plazmy nasienia, pochodzącego z pobierań na sztuczną pochwę, można stwierdzić, że są one zgodne z wynikami wcześniejszych badań Balbierza i Nikołajczuk [3]. Zmiany w obrazie AIE wydzieliny z przetok pokrywają się z obrazami obserwowanymi w elektroforegramie w żelu krochmalowym. Podobne wyniki uzyskali Hunter i Hafs [9], prowadząc identyfikację składników plazmy i surowicy krwi za pomocą podwójnej dyfuzji i immunoelektroforezy. Wykazanie aktywności esterazy hydrolizującej octan *alfa*-naftyłu oraz słabej aktywności fosfatazy zasadowej w wydzielinie przetoki świadczy, że z odcinka poniżej założenia przetoki pochodzi przynajmniej część tych aktywności, stwierdzanych w plazmie nasienia ejakulowanego.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Balbierz H., Boryczko Z., Nikołajczuk M.: Pol. Arch. wet. 16, 4, 601, 1973.
2. Balbierz H., Boryczko Z., Nikołajczuk M.: Pol. Arch. wet., 16, 3, 497, 1973.
3. Balbierz H., Nikołajczuk M.: Arch. Immun. Ther., 18, 537, 1970.
4. Balbierz H., Nikołajczuk M., Senze A., Stehlik Z.: Pol. Arch. wet., 14, 1, 99, 1971.
5. Bielański W., Ewy Z.: Zesz. probl. Post. Nauk roln., 61, 35, 1966.
6. Boryczko Z., Czapla K., Furowicz A.: Medycyna Wet., 28, 349, 1972.
7. Ewy Z., Bielański W.: XXII Int. Congr. of Physiol. Sci. Leiden, 48, 545, 1962.
8. Grabar P., Burtin P.: Analyse immuno-électrophorétique; ses applications aux liquides biologiques humains, Masson et C-ie, Paris 1960.
9. Hunter A. G., Hafs H. D.: J. Reprod. Fert., 7, 357, 1964.
10. Pernot E., Szumowski P.: Bull. Soc. Chim. biol., 40, 11, 1423, 1958.
11. Strzeżek J., Rotkiewicz T., Iiminowicz J.: Medycyna Wet., 29, 479, 1973.
12. Tischner M.: Zesz. Nauk. WSR Krak. Rozprawy, 71, 21, 1-62, 1972.

*Генрик Бальбеж, Здзислав Борычко, Мариа Николайчук, Мариан Тшинер*

#### ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЕМЕНИ ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ОТДЕЛЬНЫХ СЕКРЕЦИРУЮЩИХ ЧАСТЕЙ ПОЛОВОГО ОРГАНА БЫКА

#### Резюме

В проведенных исследованиях учитывалась предварительная идентификация происхождения отдельных белковых фракций содержащихся в секрете получаемом из канюли семяпровода и в плазме семени быков с подвязанным

(2 быка) и канюлированным семяпроводом. С помощью метода электрофореза в крахмальном желе установлено, что плазма семени подопытных быков, несмотря на исключение секрета придатков семенника и семенников, содержала все белковые фракции сосредоточенные в 5 зонах миграции. С другой стороны, в секрете из канюли семяпроводов в электрофореграмме можно было констатировать наличие лишь одной фракции в зоне I и фракций зоны III. При помощи метода иммуноэлектрофореза с сывороткой анти PSB в плазме семени было установлено наличие до 8 дуг. В секрете из канюли семяпровода обнаружена одна четкая линия в прикатодной зоне и 2-3 слабые линии в прианодной зоне.

В крестовой реакции с сывороткой анти SNB, как и в иммуноэлектрофорезе так и в двойной диффузии, в секрете из канюли и в плазме семени были обнаружены три преципитационные линии.

Установление активности эстеразы гидролизующей *альфа*-нафтилацетат и слабой активности щелочной фосфатазы в секрете из канюли свидетельствует о том, что из участка ниже канюли происходит по крайней мере часть активностей установленных в плазме эякулированного семени.

*Henryk Balbierz, Zdzisław Boryczko, Maria Nikołajczuk, Marian Tischner*

PRELIMINARY IDENTIFICATION OF PROTEIN FRACTIONS OF THE SEMEN  
PLASMA  
OBTAINED FROM PARTICULAR SECRETORY SECTORS OF THE SEXUAL  
ORGAN OF BULL

S u m m a r y

In the respective investigations a preliminary identification of origin of particular protein fractions contained in the secretion from the cannula and in the semen plasma of bulls with ligated (2 bulls) or cannulated (2 bulls) spermat ducts have been carried out. At application of the method of electrophoresis in starch gel it has been proved that plasma of semen from the experimental bulls, despite elimination of secretions from epididymis and testicles, contained all the protein fractions accumulated within 5 migration zones. On the other hand, in the secretion from the cannulas in the electrophoregram only a single fraction in the zone I and the fractions of the zone III could be found. By the immunoelectrophoretic method with the anti-PSB serum the presence in semen of 8 bows or less has been proved. In the secretion from the cannula one distinct line in the by-cathode zone and 2-3 weak lines in the by-anode zone have been revealed.

In the cross reaction with the anti-SNB serum three precipitation lines in the secretion from the cannula and in the semen plasma, both in the immunoelectrophoresis and the double diffusion, have been proved.

The proved activity of esterase hydrolyzing the *alpha*-naphtylacetate and weak activity of basic phosphatase in the secretion from the cannula confirms the presumption that from the sector below the cannula at least a part of these activities proved in the plasma of ejaculated semen would originate.

*Prof. dr hab. Henryk Balbierz*  
*Wydział Weterynaryjny AR we Wrocławiu*  
*Instytut Patologii i Terapii Zwierząt*  
*Zakład Immunopatologii i Immunogenetyki*  
*50-366 Wrocław, Pl. Grunwaldzki 47*