

ZNAKOWANIE PLEMNIKÓW PIERWIASTKAMI PROMIENIOTWÓRCZYMI *IN VITRO*

Maria K. Kierznowska

Katedra Rozrodu i Higieny Zwierząt WSR w Krakowie

Kierownik: prof. dr Władysław Bielański

Jedną z najmłodszych dziedzin badawczych XX wieku są prace dotyczące stosowania pierwiastków promieniotwórczych. Z roku na rok wzrasta liczba izotopów tych pierwiastków, wykorzystywanych dla celów różnych gałęzi nauk. Pierwiastki promieniotwórcze oprócz zastosowania w naukach technicznych i przemyśle, nabierają coraz większego znaczenia w medycynie i biologii. Do najczęściej stosowanych izotopów w tych naukach należą: P^{32} , C^{14} , S^{35} , J^{131} . Istnieją jeszcze duże trudności w możliwościach prowadzenia tego typu badań, związane z kosztem sprowadzania izotopów, możliwościami korzystania z nich i ograniczonym sposobem użytkowania. W badaniach nad zastosowaniem izotopów dotyczących rozrodu samców i samic używano najczęściej P^{32} i J^{131} , jako izotopów najbardziej dostępnych i biorących jako pierwiastek udział w metabolizmie komórek rozrodczych. Po raz pierwszy zaczęto wykonywać badania używając radioaktywny Cr^{51} w postaci chromianu sodu Na_2CrO_4 *in vitro*.

Celem pracy było określenie możliwości przyżyciowego znakowania plemników, opracowanie metody znakowania zachowującej ich żywotność, a tym samym pozwalającej na stosowanie znakowanych plemników *in vitro* do dalszych badań. Badania te dotyczą zmian w zachowaniu się plemników od najądra przez nasieniowód, cewkę moczopłciową, aż do ujścia zewnętrznego cewki u różnych gatunków zwierząt.

MATERIAŁ I METODA

Do badania użyto nasienia od 7 królików, krzyżówek dwóch ras: popielniańskiej \times kalifornijska F_2 oraz radioaktywnego chromianu sodu. Charakterystyka Cr^{51} : liczba atomowa 24, ciężar atomowy 51, emanacja (gama) γ , o energii kinetycznej 329,8⁰%, półokres trwania 26,6 dnia. Nasienie pobierano od królików w wieku co najmniej 1 roku. Żywienie było jednakowe przez cały okres doświadczenia. Norma dzienna wynosiła 30 dkg siana, 10 dkg owsa, wody *ad libitum*. Nasienie po pobraniu do

sztucznej pochwy składającej się z kalibrowanej probówki w kształcie kieliszka i gumowej nakładki z zawartością wody, poddawano ocenie szacunkowej. Nasienie pobierano od kilku samców, gdyż chodziło o otrzymanie po odwirowaniu określonej ilości plemników. Wszystkie ejakulatory zlewano do jednej kalibrowanej probówki. Następnie z całej otrzymanej ilości nasienia pobierano 0,1 ml w celu obliczenia koncentracji plemników. Wahania koncentracji wynosiły od 40 do $120 \cdot 10^6$ pl./ml. Nasienie poddawano następnie wirowaniu przy 4000 obr./min. przez 15 min. Osocze nasienia odlewano, a do 0,5 ml plemników otrzymanych po wirowaniu dodawano: 2,5 ml płynu Ringera, 0,5 ml izotopowego chromianu sodu. Chromian sodu Na_2CrO_4 otrzymywano z Instytutu Badań Jądrowych w Świerku, w postaci izotonicznego roztworu przygotowanego na wodzie apyrogennej, sterylizowanego o pH ok. 7 i określonej aktywności właściwej, ilości, objętości i ciężarze.

Aktywność dodawanego preparatu wynosiła 100 μCi w 0,1 ml roztworu. Po dokładnym mieszaniu wszystkich części składowych pobierano na płytki aluminiowe po 0,1 ml badanego nasienia, które służyło jako wzorzec — standard. Jednocześnie sprawdzono żywotność nasienia i dokonano ocenę ruchliwości.

Doświadczenie podzielono na dwa etapy. Pierwszy etap obejmował próbę znakowania plemników *in vitro*, w temperaturze $+35^\circ\text{C}$, drugi etap w temperaturze $+4^\circ\text{C}$. Jako kontrolę prowadzono badanie przeżywania plemników Na_2CrO_4 nieradioaktywnych. W obydwu etapach po pobraniu materiału na wzorzec, plemniki zawieszano w płynie Ringera i roztworze Cr^{51} i inkubowano przez okres 4 godz. Po upływie tego czasu badane próbki wirowano przez 15 min. i przy 4000 obr./min. Na dwie płytki aluminiowe pobierano po 0,1 ml supernatantu i dodawano ok. 0,1 ml wody destylowanej, celem równomiernego rozprowadzenia na płycie badanego materiału. Pozostałą część supernatantu odlewano i odpipetowywano, a do osadu złożonego z 0,5 ml plemników dodawano 2,5 ml płynu Ringera, dokładnie mieszano i pobierano $2 \times 0,1$ ml na dwie płytki aluminiowe. Jednocześnie dokonywano oceny mikroskopowej nasienia, badając jego ruchliwość i żywotność. Tę samą czynność powtarzano po 6 i 8 godz. Wszystkie płytki aluminiowe wraz z badanym materiałem suszono w temperaturze $+50^\circ\text{C}$ przez okres 24 godz. Po upływie tego czasu dokonywano pomiaru aktywności badanych próbek przy pomocy licznika scyntylicyjnego, przelicznika elektronowego i przystawki sterującej, ustalając napięcie = 900 V, stałą czułość dyskryminatora = 5 i stały czas = 1 min. Każda próbka była odczytywana 10-krotnie. Z otrzymanych cyfr obliczano średnią. W związku ze stałym ubytkiem masy z początkowego wzorcowego materiału do końca próby, chcąc obliczyć procent absorpcji Cr^{51} przez plemniki, ułożono wzór matematyczny, dostosowując go do doświadczenia:

$$N_w = N_r + N_p$$

N_w — cyfra wyrażająca ilość impulsów na minutę w standardzie,

N_r — cyfra wyrażająca ilość impulsów na minutę po upływie 4 godz. inkubacji w próbce z płynem Ringera,

N_p — cyfra wyrażająca ilość impulsów na minutę w plemnikach królika po upływie 4 godz.

Po 4 godzinach inkubacji liczone

$$W_1 = N_w - N_r$$

W_1 — nowo powstały wzorec, który liczone ze względu na pobranie 0,3 ml na płytki aluminiowe, a więc ze standardu ubyło tyleż ml, wobec powyższego W_1 rzeczywiste = $W_1 + 0,3 \times W_1$.

Dalszy tok myślenia jest analogiczny jak przy obliczaniu procentu absorpcji we wzorcu:

$$\frac{N_4}{N_{w_1}} 100 = \% \text{ zaabsorbowanego } Cr^{51} \text{ w roztworze Ringera,}$$

$$\frac{N_p}{N_{w_1}} 100 = \% \text{ absorpcji } Cr^{51} \text{ w plemnikach.}$$

Po 6 godz. inkubacji obliczamy:

$$W_2 = W_1 + 0,3 \times W_1 - Nr_1$$

W_2 rzeczywiste = $W_2 + 0,3 \times W_2$.

Dalsze przeliczanie procentów przebiega tak samo jak podano wyżej. Po 8 godz. inkubacji

$$W_3 = W_2 - Nr_2$$

W_3 rzeczywiste = $W_3 + 0,3 \times W_3$.

Przeliczanie procentów jak powyżej.

Nasienie kontrolne nieznakowane wirowane przez 15 min. przy 4000 obr./min., odlewano osocze i dodawano roztwór izotoniczny chromianu sodu nieradioaktywnego. W atęcie otrzymanym z każdą przesyłką Cr^{51} otrzymywaną z Instytutu Badań Jądrowych w Świerku podawaną aktywność właściwą w mCi/mg Cr, przeliczano na g/ml. Otrzymaną ilość chromianu sodu odważano i rozcieńczano roztworem apyrogennym do 100 ml. Do 0,5 ml plemników dodawano otrzymany roztwór. Badanie przeżywania plemników przeprowadzono dokładnie tak samo jak badanie plemników radioaktywnych, tzn. oceny dokonywano po przygotowaniu wzorca po 4, 6 i 8 godz. inkubacji od początku badania w temperaturze $+35^\circ C$ i $+4^\circ C$.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1-3 oraz na wykresie graficznym po zaokrągleniu liczb.

W pierwszym etapie doświadczenia aktywność zaabsorbowanego Cr^{51}

przez plemniki wykazuje zmiany w różnych okresach czasu inkubacji. Po 4 i po 8 godz. inkubacji procent absorpcji niewiele się różni. Wyraźny wzrost procentu obserwujemy po upływie 6 godz. Ocena żywotności

Tabela 1

Wyniki znakowania plemników *in vitro* Cr⁵¹ w porównaniu z czasem ich przeżywania

Temperatura	% zaabsorbowanego Cr ⁵¹ przez plemniki i ocena żywotności plemników w %							
	wzorzec	po 4 godz.	po 6 godz.	po 8 godz.	wzorzec	po 4 godz.	po 6 godz.	po 8 godz.
+35°C	100	32,33	56,22	39,76	3,5/76,6	2,2/41,1	1,7/20,0	1/10
+ 4°C	100	27,63	56,92	34,80	3,1/75	2,1/52,2	1,2/24,2	2/20

Tabela 2

Procent Cr⁵¹ w płynie Ringera

Temperatura	Po 4 godz.	Po 6 godz.	Po 8 godz.
+35°C	67,00	20,31	18,14
+ 4°C	72,37	23,11	6,18

Tabela 3

Przeżywanie plemników królika w nieradioaktywnym chromianie sodu Na₂CrO₄

Temperatura	Wzorzec	Po 4 godz.	Po 6 godz.	Po 8 godz.
+35°C	4,25/82,5	2,12/52,5	1,4/32	1/12
+ 4°C	4/90	2,43/57,85	1,66/38,0	0/20

plemników charakteryzuje się czasem przeżywania trwającym do 8 godz. Zaledwie w 2 wypadkach czas przeżywania wynosił 10 godz. Procent Cr⁵¹ w płynie Ringera w miarę upływu czasu wyraźnie malał. W drugim etapie doświadczenia różnice pomiędzy absorpcją przez plemniki Cr⁵¹ po 4 i 8 godz. inkubacji układają się podobnie. I w tym etapie po 6 godz. jest najwyższy procent absorpcji. Ocena żywotności plemników przemawia na korzyść badań prowadzonych w drugim etapie, tzn. w temperaturze +4°C. Procent Cr⁵¹ w płynie Ringera maleje wyraźniej niż w temperaturze +35°C. Przeżywanie plemników królika w nieradioaktywnym chromianie sodu przemawia, ze względu na ruchliwość plemników, również na korzyść badania w temperaturze +4°C.

DYSKUSJA

Przy opracowywaniu metody znakowania plemników królika Cr^{51} *in vitro* oparto się na pracy Gogacza [2]. Autor ten znakował bakterie stosując Cr^{51} i podobny czas inkubacji. Ze względu na powinowactwo struktury biochemicznej błony komórkowej do błony główki plemnika, zdecydowano się na próbę przeprowadzania badania analogicznego z pewną modyfikacją metody. W badaniach dotyczących znakowania krwinek czerwonych przy pomocy Cr^{51} Przała (1965) stwierdził, że krwinki czerwone wprowadzone do organizmu podlegają takim samym prawom, jak krwinki nieznakowane. Cr^{51} uwolnione z krwinek czerwonych po ich rozpadzie nie wchodzi w związki wtórne. Jest wydalany z organizmu na zewnątrz wraz z moczem, lub częściowo z odchodami. Amann i współ. [1] używali do znakowania plemników tymidyny trytowanej dootrzewnowo. Próbę tę przeprowadzili na królikach. Po upływie miesiąca aktywność malała, a w następnym miesiącu stosowanie tego izotopu działało destruktywnie na plemniki. Żebienkienie-Matikajtje znakował plemniki przy pomocy P^{32} *in vivo* u tryków. Na otrzymanie ejakulatu zawierającego znakowane plemniki potrzebny był okres 30-38 dni. Wiele miejsca w literaturze zajmują studia nad stosowaniem izotopów w badaniach dotyczących metabolizmu nasienia. Flipse [3] stosował C^{14} do znakowania nasienia celem przebadania zmian zachodzących w plemnikach buhaja odnośnie cukrów, fosfolipidów i glicyny. Stwierdził, że można tą drogą badać przebieg metabolizmu tych związków. Takeda i współ. [5] znakowali plemniki królików P^{32} *in vivo* i stwierdzili, że aktywność ich kształtowała się odmiennie w każdym ejakulacie.

WNIOSKI

1. Powyższa metoda pozwala na znakowanie plemników *in vitro* przy pomocy Cr^{51} .
2. Plemniki królika osiągają największy procent absorpcji Cr^{51} w temperaturze $+4$ i $+35^{\circ}\text{C}$ po upływie 6 godz. inkubacji.

PIŚMIENNICTWO

1. Amann R. P., Koefoed-Johnsen H. H., Levi H.: Excretion pattern of labelled spermatozoa and the timing of spermatozoa formation and epididymal transit in rabbits injected with thymidine 3H . J. Reprod. Fertil. 10, 169, 1965.
2. Gogacz E.: The use of radioactive chromium-51 for labeling bacteria. Bull. Vet. Inst. Puławy 10, 152-156, 1966.
3. Flipse R. J.: Isotopic studies of semen metabolism. Pennsylvania Agric. Exp. Sta. 3, 234-242, 1957.
4. Przała F.: Dobowa produkcja i destrukcja krwinek czerwonych u prosiąt osesków. Praca doktorska. Olsztyn 1957.
5. Takeda A., Lutwak-Mann C., Mann T.: Labelling of semen with radioactive phosphate. J. Reprod. Fert. 16, 141, 1968.

6. Żebienkienie-Matikajtie: Kaunaski Mediciński Institut Aftoreferat. Izučenie spermatogeneza na fonie nekotorych vešnich faktorov, s primeniem metoda radioaktivnych izotopov.

M. K. Keжновска

МЕЧЕНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ РАДИОАКТИВНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ IN VITRO

Резюме

Целью труда была разработка методики мечения сперматозоидов радиоактивным Na_2CrO_4 , установление возможности их мечения *in vitro* и влияние мечения на их жизнеспособность.

Исследования проводили с семенной жидкостью 7 кроликов одного возраста, веса и одной и той же породы. После предварительной оценки, семенную жидкость центрифугировали и к полученным таким образом сперматозоидам в объеме 0,5 мл прибавляли 2,5 мл раствора Рингера, содержащего 100 мккюри Cr-51. Полученную смесь подвергали инкубации в условиях повышенной (35°) и пониженной (4°) температуры.

В результате установлена возможность мечения сперматозоидов радиоактивным Cr-51. Наибольшую скорость мечения наблюдали в температуре 4° и 35° , при 6-часовой инкубации.

M. K. Kierznowska

SPERMATOOA LABELLING WITH RADIOACTIVE ELEMENTS IN VITRO

Summary

This study was undertaken to work out a system of labelling spermatozoa with the radioactive Na_2CrO_4 as well as to find out, if spermatozoa could be labelled *in vitro* and how far it affected their survival. The experimental material consisted of the semen obtained from 7 rabbits of identical weight, age and breed. After a preliminary estimate the semen was centrifuged. To 0.5 ml of spermatozoa 0,5 ml = 100 μ Cr^{51} and 2.5 ml Ringer's solution were added. This solution constituted standard for the tests to follow.

The experiment was divided into two stages. At the first stage the semen under study was incubated together with Cr^{51} for the period of 8 hours in the temperature $+35^\circ\text{C}$, while in the second one the temperature was $+4^\circ\text{C}$.

The control constituted unlabelled semen prepared analogously as the solution containing Cr^{51} . The results of the investigation indicate that it is possible to label rabbit spermatozoa with the isotope Cr^{51} . The greatest power of Cr^{51} assimilation by spermatozoa was found to occur in the temperature $+4^\circ\text{C}$ and $+35^\circ\text{C}$ after 6 hours of incubation.