

PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIE WYBRANYCH TESTÓW ENZYMATYCZNYCH
DO OCENY STANU BŁON CYTOPLAZMATYCZNYCH PLEMNIKÓW BUHAJA
PO ZAMROŻENIU W CIEKŁYM AZOCIE *

Jerzy Strzeżek

Zakład Biochemii Zwierząt Instytutu Fizjologii
i Biochemii Zwierząt AR-T w Olsztynie

Henryk Zięciak, Jerzy Koblański, Wacław Aksiuto

Okręgowa Stacja Hodowli Zwierząt w Olsztynie

Nasze wcześniejsze badania wskazywały, że na każdym z etapów technologii zamrażania nasienia buhaja w ciekłym azocie plemniki podlegają wpływowi różnych czynników fizykochemicznych naruszających ich struktury oraz zmieniających właściwości biochemiczne [10-14].

Według wielu autorów istnieje potrzeba wprowadzenia do praktyki sztucznego unasienniania testów biochemicznych pozwalających określić stopień uszkodzenia plemników w procesie zamrażania nasienia. Stwierdzono bowiem istotne zależności pomiędzy aktywnością niektórych enzymów w plazmie nasienia a jego zdol-

* Praca wykonana w ramach problemu resortowego 419E Ministerstwa Rolnictwa, koordynowanego przez Instytut Zootechniki w Krakowie.

nością zapładniająca [5, 7-9]. Testy te oparte są na oznaczaniu „wycieku” niektórych enzymów lub innych organicznych bądź nie-organicznych komponentów plemników do plazmy nasienia [2-5].

Celem naszej pracy była próba zastosowania testu aminotransferazy asparaginianowej (test GOT) oraz testu hialuronidazy (test HD) dla rokowania o wartości biologicznej nasienia buhaja po rozmrożeniu.

MATERIAŁ I METODY

Nasienie do badań pobierano od buhajów użytkowanych w Stacji Hodowli i Unasienniania Zwierząt w Olsztynie w okresie od 5 czerwca do 10 grudnia 1978 r. Zamrażanie nasienia w ciekłym azocie przeprowadzono zgodnie z technologią powszechnie stosowaną w zakładach unasienniania przy użyciu rozcieńczalnika żółtkowo-cytrynianowo-fruktozowego. Analizy biochemiczne przeprowadzono w warunkach laboratorium zakładu unasienniania po rozcieńczeniu nasienia, a następnie po jego rozmrożeniu.

Dotyczyły one oznaczania:

- 1) aktywności aminotransferazy asparaginianowej (test GOT) według metody Reitmana i Fränkela [6],
- 2) aktywności hialuronidazy (test HD) według metody Barretta [1] w modyfikacji Foukles i Watson [3], adaptowanej przez nas dla nasienia buhaja [10].

Uzyskane wyniki aktywności enzymów podano w jednostkach na 10^9 plemników. Dla uniknięcia „wycieku” enzymów z plemników w trakcie wirowania nasienia zastosowano, sprawdzoną w naszym laboratorium, metodykę przygotowania prób do analiz biochemicz-

nych [10]. Ogółem poddano technologii zamrażania 111 ejakulatów pochodzących od 22 buhajów. Próby nasienia, odpowiadające normie ruchliwości plemników po rozmrożeniu (30% plemników o ruchu postępowym), przekazywano do punktów unasienniania i wykonano 3399 zabiegów inseminacyjnych, a następnie wyliczono wskaźniki niepowtarzalności po pierwszym unasiennianiu samic.

Przeprowadzono analizy statystyczne wyników badań biochemicznych poszczególnych ejakulatów oraz wyliczono współczynniki korelacji pomiędzy wyciekami enzymów w poszczególnych etapach technologii a wskaźnikami niepowtarzalności.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Średnia aktywność aminotransferazy asparaginianowej (GOT) w plazmie nasienia, bezpośrednio po pobraniu ejakulatu, wynosiła $73,42 \pm 36,49$ j/ 10^9 plemników, zaś hialuronidazy $5,36 \pm 2,64$ j/ 10^9 plemników.

W naszych badaniach ejakulatory, które charakteryzowały się negatywnym wynikiem mrożenia, już na etapie rozcieńczania nasienia wykazywały wzrost aktywności GOT oraz hialuronidazy w plazmie nasienia (tab. 1) w stosunku do podanych wyżej wartości. Zjawisko „wycieku” enzymów z plemników pogłębiało się zapewne w trakcie etapu ekwilibracji oraz mrożenia prób, bowiem po ich rozmrożeniu obserwowano dalsze intensywne uwalnianie GOT (25% wzrost aktywności w plazmie) oraz hialuronidazy (42% wzrost aktywności).

Powyższe wyniki wskazywać mogą na dużą wrażliwość błon cytoplazmatycznych plemników niektórych ejakulatów na etapy postępowania technologicznego. Spośród objętych obserwacją 22 buhajów,

5 oddawało ejakulatory szczególnie podatne na uszkodzenia kriobiochemiczne. Ejakulatory te były wybrakowane ze względu na niską ruchliwość plemników po rozmrożeniu.

Tabela 1

Charakterystyka kriobiochemiczna ejakulatów
z negatywnym wynikiem mrożenia ($n = 41$)

	GOT		HD	
	po rozcień- czeniu	po rozmro- żeniu	po rozcień- czeniu	po rozmro- żeniu
\bar{x}	282,87	354,83	7,75	11,03
S	127,4	212,59	4,77	7,76
v	50,0	59,91	61,55	70,31

Zmiany kriobiochemiczne w ejakulatach wykazujących 30% plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu przedstawiono w tabeli 2. Zwraca uwagę słabiej zaznaczony efekt rozcieńczenia nasienia, przejawiający się niższymi wartościami wzrostu aktywności badanych enzymów w plazmie. W przypadku GOT efekt rozcieńczenia przypuszczalnie spowodowany jest „wypieraniem” z powierzchni błony plazmatycznej plemnika puli enzymu związanego, z plazmy nasienia [14], w odniesieniu do hialuronidazy stanowi zapewne wynik uszkodzenia lub zmiany przepuszczalności zewnętrznej błony akrosomu. Podobny efekt obserwowali Śmigielka i Strzeżek [13] w badaniach plazmowych inhibitorów akrosyny oraz Al-Taha i Strzeżek [14] w badaniach dotyczących akrosyny. Uzyskane istotne, ujemne wartości współczynników ko-

Tabela 2

Charakterystyka biochemiczna oraz wartość biologiczna ejakulatów spełniających wymóg ruchliwości plemników po rozmrożeniu (n = 70)

	GOT		HD		Wskaźnik niepowtarzalności	Liczba inseminacji
	po rozcień- zeniu	po rozmro- żeniu	po rozcień- zeniu	po rozmro- żeniu		
\bar{x}	245,18	265,96	6,57	7,39	78,88	3399
s	114,47	89,26	6,73	6,74	18,60	
v	46,69	33,56	102,43	91,22	23,58	
r	-0,286 ^x	-0,540 ^{xx}	-0,255 ^x	-0,106 ^x	-	

Różnica statystycznie istotna

^xP \leq 0,05,

^{xx}P \leq 0,01.

relacji pomiędzy „wyciekami” GOT i hialuronidazy a wskaźnikami niepowtarzalności świadczą o niskiej zdolności zapładniającej plemników, które tracą enzymy już w momencie rozcieńczenia nasienia.

Zamrożenie - rozmrożenie ejakulatów omawianej grupy powoduje tylko niewielki wzrost „wycieku” obu enzymów do plazmy. Tym niemniej w przypadku GOT „wyciek” enzymu nasilony przypuszczalnie w niektórych ejakulatach koreluje wysoce istotnie z wskaźnikiem niepowtarzalności ($r = -0,54$, $P < 0,01$). Przypuszczalnie przyczyną obserwowanego zjawiska jest obniżenie przeżywalności plemników w żeńskich drogach płciowych wskutek destrukcyjnych uszkodzeń kriogenicznych spirali mitochondrialnej tych komórek.

Intensyfikacja zależności pomiędzy intensywnością „wycieku” enzymów do plazmy nasienia na poszczególnych etapach technologicznych a zróżnicowanymi wartościami wskaźników niepowtarzalności przedstawiono w tabeli 3.

Stwierdzić należy, że ejakulatory charakteryzujące się bardzo wysoką wartością biologiczną po rozmrożeniu (wskaźnik niepowtarzalności 80-90%) wykazują umiarkowane zmiany kriobiochemiczne plemników. Żaden z badanych wskaźników biochemicznych w tej grupie ejakulatów nie koreluje istotnie z wskaźnikami niepowtarzalności. Zjawisko to może wynikać również ze stosunkowo niewielkiej liczby wykonanych analiz (30 ejakulatów, 1466 zabiegów inseminacyjnych).

W grupie ejakulatów wykazujących wskaźnik niepowtarzalności poniżej 70% zaobserwować można wysokie „wycieki” analizowanych enzymów już na etapie rozcieńczenia nasienia. W przypadku

Zmiany kriobiochemiczne nasienia a wskaźniki niepowtarzalności

Wskaźniki niepowtarzalności																					
powyżej 90%					89,9-80,0%					79,9-70%											
GOT		HD		NR	GOT		HD		NR	GOT		HD		NR							
1	2	1	2	%	1	2	1	2	%	1	2	1	2	%							
\bar{x}	180,4	262,5	2,61	4,1	96,2	236,0	249,3	6,35	9,07	84,24	265,7	269,0	6,17	9,75	74,74	316,1	291,6	12,35	6,35	59,33	
x	44,6	56,2	3,18	4,73	3,58	69,8	109,8	5,2	4,7	2,6	36,6	109,6	4,61	4,69	2,42	98,1	128,5	12,9	3,68	7,68	
v	24,8	21,5	122,0	115,3	3,72	75,7	44,0	78,8	50,7	3,1	13,8	40,6	74,7	48,1	3,24	31,02	44,1	105,0	52,9	12,94	
r	+0,18	+0,12	+0,19	+0,38		+0,96 ^{xx}	+0,22	+0,32	+0,05		+0,10	-0,13	-0,44 ^x			+0,73 ^x	+0,18	-0,64 ^x	+0,33		
n					9					21										31	9
Liczba inseminacji					438					1028										1496	437

Różnica statystycznie istotna

^x przy $P < 0,05$,^{xx} przy $P < 0,01$.

Objaśnienia

1 - po rozcieleniu,

2 - po rozmrożeniu,

NR - średnia wartość wskaźnika niepowtarzalności w grupie,

 n - liczba ejakulatów.

GOT zjawisko to może być spowodowane wysoką aktywnością enzymu w plazmie nasienia tych osobników i wiązaniu go na powierzchni błony plazmatycznej bezpośrednio po ejakulacji. Wynika stąd zapewne dodatnia wartość współczynnika korelacji ($r = +0,73$; $P < 0,05$). Odnośnie do hialuronidazy stwierdza się na etapie rozcieńczenia nasienia tej grupy prawie 2-krotnie wyższe wartości uwalnianego enzymu w porównaniu do pozostałych grup ejakulatów. Wysoki współczynnik zmienności potwierdza naszą wcześniej wysuniętą sugestię o „hialuronidazowym” typie reakcji niektórych ejakulatów na pierwszy etap postępowania technologicznego. Obniżona w ten sposób wartość biologiczna ejakulatów potwierdzona została wysoką ujemną wartością współczynnika korelacji pomiędzy „wyciekami” hialuronidazy a wskaźnikiem niepowtarzalności ($r = -0,64$; $P < 0,05$). Podobne zjawisko obserwuje się w grupie ejakulatów z wartością wskaźnika niepowtarzalności 70-80% ($r = -0,44$; $P < 0,05$).

Należy nadmienić, że nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy „wyciekami” hialuronidazy na etapie zamrożenia - rozmrożenia nasienia a wskaźnikiem niepowtarzalności. Zjawisko to może być spowodowane częściową denaturacją uwolnionego wcześniej enzymu podczas głębokiego zamrażania nasienia.

Rezultaty naszych badań wskazują, że najlepszą wartość biologiczną po rozmrożeniu posiadają te ejakulatory, które charakteryzują się umiarkowanymi zmianami biochemicznymi plemników. Eliminacja z rozrodu ejakulatów nie rokujących wysokich efektów biologicznych po rozmrożeniu wydaje się być aktualnie jednym z podstawowych problemów doskonalenia technologii zamrażania nasienia buhaja. Testy enzymatyczne, pozwalające w miarę

szybko ocenić stan struktur plemników, mogą być do realizacji tego zadania szczególnie przydatne, wzbogacając stosowane dotychczas klasyczne metody oceny jakości nasienia. Jak wynika z naszych badań, już wstępna reakcja plemników na czynniki środowiskowe, przejawiająca się „wyciekami” enzymów, może być sygnałem o nadwrażliwości tych komórek na udary chłodowe, powodujące w końcowym efekcie obniżenie zdolności zapładniającej mrożonego nasienia.

Jeżeli w przypadku testu GOT nie zawsze precyzyjnie można wnioskować o przejawach ujemnego wpływu środowiska mrozeniowego na plemniki (enzym wiązany na powierzchni plemników z plazmy), to test hialuronidazowy wydaje się być obiektywnym wskaźnikiem stopnia uszkodzenia akrosomu plemników.

Z powyższych względów oznaczanie aktywności hialuronidazy oraz aminotransferazy asparaginianowej w plazmie na poszczególnych etapach biotechnologii zamrażania nasienia stanowić powinno w najbliższym okresie istotny wskaźnik w rokowaniu wartości biologicznej plemników po rozmrożeniu nasienia.

PIŚMIENNICTWO

1. Barrett A.I.: Lysosomal enzymes. In: Lysosomes, A Laboratory Handbook, Ed. J.T. Dingle, North Holland, Amsterdam - London, 46, 1972.
2. Crabo B.G., Brown K.I., Graham E.F.: Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. J. Anim. Sci., 35, 377, 1972.
3. Foukles I.A., Watson P.A.: Hyaluronidase activity in seminal plasma as a method of assessing bull sperm integrity. J. Reprod. Fert., 43, 349, 1975.

4. Nath J., Patt J.: Biochemical changes associated with freezing in ram semen. *Cryobiology* 6, 522, 1970.
5. Pace M.M., Graham E.F.: The release of glutamic oxaloacetic transaminase from bovine spermatozoa as a test method for assessing semen quality and fertility. *Biol. Reprod.*, 3, 140, 1970.
6. Reitman S., Fränkel S.: A colorimetric method for the determination of serum GOT and serum GPT. *Amer. J. Clin. Path.*, 28, 56, 1957.
7. Roussel J.D., Stallcup O.T.: Paralelism between semen characteristics and glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase activities. *J. Dairy Sci.*, 48, 1684, 1965.
8. Roussel J.D., Stallcup O.T.: Relationship between phosphatase activity and other charactersitics in bull semen. *J. Reprod. Fert.* 12, 423, 1966.
9. Stallcup O.T.: Acid and alkaline phosphatase activity in bovine semen as related to fertility. *J. Dairy Sci.*, 48, 752, 1965.
10. Strzeżek J., Śmigielska J., Al-Taha T.J.: Wpływ różnych temperatur na uwalnianie enzymów z plemników buhaja podczas zamrażania i rozmrażania nasienia. *Medycyna Wet.*, 35, 353, 1979.
11. Strzeżek J., Al-Taha T.J., Śmigielska J., Hosaja M.: Charakterystyka biochemiczna plemników buhaja po długookresowym przechowywaniu w ciekłym azocie. *Medycyna Wet.*, 35, 626, 1979.
12. Strzeżek J., Śmigielska J., Czeozot H., Al-Taha T.J., Glogowski J., Liminowicz J.: Kriobiochemiczne zmiany w nasieniu buhaja, tryka i kńura. *Płodność i niepłodność zwierząt gospodarskich, cz. II*, PWRiL, Poznań 1979.
13. Śmigielska J., Strzeżek J.: Aktywność inhibitorów akrosyny w plazmie podczas zamrażania nasienia buhajów w ciekłym azocie. *Medycyna Wet.*, 35, 500, 1979.
14. Taha J. Al-Taha, Strzeżek J.: Kriobiochemiczne zmiany plemników buhajów w warunkach technologii mrożenia nasienia

stosowanej w zakładzie unasienniania. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. 263, 199, 1986.

J. Strzeżek, H. Zięciak, J. Koblański, W. Aksiuto

PRACTICAL APPLICATION OF SELECTED ENZYMATIC TESTS
FOR ESTIMATING THE CONDITION OF CYTOPLASMATIC MEMBRANES
OF BULL SPERMATOZOA FOLLOWING FREEZING

S u m m a r y

The authors tried to introduce into A.I. laboratory practice the determination of hyaluronidase activity (acrosome enzyme) and GOT activity (middle piece enzyme); these tests allow comparatively quickly to receive an objective information on the intensity of enzyme leakage from spermatozoa in the course of freezing technology and indirectly on their biological value after thawing.

It was found that ejaculates disposed off due to poor freezability were characterized by high leakage of investigated enzymes already on the step of dilution. High correlation has been found between the leakage of GOT and hyaluronidase and the non return rate. These results show, that both tests are of practical value and allow more precisely estimate the semen quality post thawing.

Е.Стшэжек, Г.Зенцяк, Е.Кобленьски, В.Аксиуто

Практическое применение выбранных тестов энзиматических для оценки состояния цитоплазматичных оболочек живчиков быка после замораживания семени в жидком азоте

Незюме

Поднято попытку внедрения в лабораторную практику на станциях осеменения тестов для обозначения активности гиалуронидазы (энзим акросомы) и аминотрансферазы аспарагинановой (энзим соединительной части), которые в меру скоро будут информировать о интенсивности "вытека" энзимов из живчиков во время процесса тахнологического и косвенно также о их биологической ценности после оттаяния семени.

Установлено, что эякуляты дисквалифицированы как "незамороженные" характеризовались высоким "вытеком" исследуемых энзимов уже на этапе разбавления семени. Установлена существенная взаимосвязь между "вытеком" ГОТ и гиалуронидазы и показателем неповторяемости.

Полученные результаты показывают, что оба энзиматические тесты могут найти применение как добавочный метод при оценке качества семени до оттаяния.