

WSTĘPNE BADANIA NAD ZAWARTOŚCIĄ KWASU  
L-ASKORBINOWEGO, KWASU DEZOKSYRYBONUKLEINOWEGO  
I FRUKTOZY W NASIENIU TRYKÓW

ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ,  
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ФРУКТОЗЫ СПЕРМЫ БАРАНОВ

PRELIMINARY STUDIES ON THE CONTENTS OF ASCORBIC ACID, DEZOXYRIBONUCLEIC  
ACID AND FRUCTOSE IN RAMS SEMEN

*L. Kastyak, J. Strzeżek*

Pracownia Biologii Rozrodu i Inseminacji Katedry Hodowli Ogólnej Zwierząt WSR,  
Olsztyn

Kierownik: dr Lesław Kastyak

Obecnie stosowane metody oceny nasienia oparte są głównie na określeniu objętości ejakulatu, koncentracji plemników, ich ruchliwości, morfologii i przynależności oraz na badaniach niektórych testów metabolizmu, jak: indeksu fruktolizy, zużycia tlenu przy oddychaniu plemników, szybkości odbarwiania błękitu metylenowego. Wszystkie jednakże wspomniane metody nie dają jeszcze w pełni obiektywnej oceny zdolności zapładniającej nasienia. W związku z powyższym prowadzone są liczne badania nad znalezieniem takiej metody, która pozwoliłaby określić faktyczną jego wartość biologiczną. Ostatnio zwrócono szczególną uwagę, między innymi, na zawartość DNA, który odgrywał rolę nie tylko w procesie dziedziczenia ale i przy zapłodnieniu. Wyniki badań wykazały mianowicie stosunkowo wysoką zależność między ilością DNA a jakością nasienia i jego zdolnością zapładniającą Eapen i Nasir Raza (1963 a), Leuchtenberger C. i Leuchterberger R. (1958), Leuchtenberger C. i Leuchtenberger R. (1960), Welch i Hanly (1961 a) Welch i współpracownicy (1961 b), Parez i współpracownicy (1960), Meyhöfer (1963), Tynecki i współpracownicy (1965). Stwierdzono również zmiany zachodzące w ilości DNA w trakcie przechowywania nasienia — Salisbury (1960), Summerhill i Olds (1961), Segina i Norman (1964).

Stosunkowo nieliczne są jednak prace nad zawartością DNA a jakością nasienia tryka.

Ważnym również związkiem, zdaniem niektórych autorów, jak Eapen i Nasir Raza (1963 b), Barakat, Ahmed i Abdala (1958), Mann (1964), jest kwas L-askorbinowy, któremu przypisywana jest rola czynnika chroniącego nasienie przed utlenieniem. Stwierdzono bowiem współzależność między jego zawartością a jakością nasienia — Phillips i współpracownicy (cyt. za Mannem 1964), Koets i Michelson (1956), Eapen i Raza Nasir (1963 a).

Zawartość natomiast fruktozy w nasieniu jest wskaźnikiem aktywności hormonalnej jąder (Mann 1948) i zależy od szeregu czynników Kastyak (1965).

Biorąc powyższe pod uwagę, celem niniejszej pracy jest wstępne zbadanie zależności między podstawowymi wskaźnikami właściwości nasienia, jak: objętość ejakulatu, koncentracją plemników, ilością ich w ejakulacie, ruchliwością, procentem plemników patologicznych, pH a zawartością DNA, kwasu L-askorbinowego i fruktozy.

### *Materiał i metodyka*

Do badań użyto nasienie pochodzące od 36 tryków (wśród których 11 osobników posiadało obniżoną jakość). Nasienie pobierano do sztucznej pochwy i określano: a) objętość ejakulatu; b) koncentrację plemników w  $1 \text{ mm}^3$  (poprzez obliczanie ilości plemników w 40 prostokątach na dwóch siatkach komory Bürkera); c) ilość plemników w ejakulacie; d) ruchliwość plemników według skali 5 punktowej; e) procent plemników patologicznych (rozmaży nasienia barwiono metodą Brendana-Farelly-Eibl 1959); f) pH nasienia (przy pomocy pehametru firmy Seibold, stosując specjalną mikroelektrodę i standardy firmy J. Georgica i Ska); g) zawartość fruktozy metodą Roe, zmodyfikowaną przez Manna (1948); h) zawartość kwasu dezoksyrybonukleinowego według metody Schmidta i Thannhausera (1945), przystosowanej do nasienia przez Summerhilla i Oldsa (1961); ilość DNA określano na podstawie kolorymetrycznego oznaczania zawartości dezoksyrybozy według metody Dische, podanej przez Glicka (1954), używając kolorymetr „Specol” firmy Zeissa, przy długości fali świetlnej  $L = 595 \text{ m}\mu$ ; odczyty dokonywano z wykreślonej uprzednio krzywej standardowej, sporządzonej z czystego DNA firmy Calbiochem Los Angeles 63; i) zawartość kwasu L-askorbinowego, według metody Roe i Kuethera, podanej przez Glicka (1954), z 2,4 dwunitrofenylohydrazyną, przystosowanej przez autorów do nasienia. Do próbki z 5 ml kwasu trójchlorooctowego (6%) dodawano mianowicie 0,5 ml nasienia tryka. Po upływie 5 minut dodawano 0,5—1 g węgla aktywowanego. Następnie, po dokładnym wymieszaniu, próbkę wirovano przez 10 minut przy 3000 obr./min., po czym sączono. Do 2 ml przesączu (odbiączona plazma) dodawano 0,5 ml 2,4 dwunitrofenylohydrazyny i kroplę tiomocznika. Próbkę właściwą i kontrolną umieszczano

w łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 3 godziny. Po przeniesieniu badanych prób do lodu do każdej z nich dodawano kroplami po 3 ml 85% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po 30 minutach próbki kolorymetrowano stosując filtr o długości fali 540 nm. Ilość kwasu L-askorbinowego wyliczano z krzywej wzorcowej.

### Wyniki i ich omówienie

Otrzymane średnie dane z przeprowadzonych badań poszczególnych wskaźników właściwości oraz zawartości fruktozy, kwasu L-askorbinowego i DNA w rozbiciu na dwie grupy tryków (I — posiadającą nasienie w granicach normy i II — charakteryzującą się nasieniem o obniżonych wskaźnikach jego właściwości) przedstawiono w tabeli 1. Z przytocz-

Tabela 1. Kształtowanie się średnich wskaźników właściwości nasienia oraz zawartości fruktozy, kwasu L-askorbinowego i DNA

Wskaźniki właściwości nasienia	Nasienie normalne	Nasienie patologiczne
Objętość ejakulatu w ml	1,27	1,08
Koncentracja plemników w mln	2,88	1,35
Ilość plemników w ejakulacie w mld	3,75	1,47
Ruchliwość plemników	4,59	0,17
pH nasienia	6,73	7,37
Procent plemników patologicznych	11,6	55,5
Zawartość fruktozy w mg/100 ml	591	390
Zawartość kwasu L-askorbinowego mg/100 ml	7,41	4,78
Zawartość DNA mg/100 ml	835,1	563,3
Zawartość DNA 10 <sup>9</sup> plemników	2,93	4,14

nych wyników widać, że nasienie tryków mające obniżoną koncentrację plemników, małą ich ilość w ejakulacie oraz duży procent plemników patologicznych i bardzo słabą ruchliwość, posiadało niższą zawartość fruktozy, mniej kwasu L-askorbinowego i DNA w porównaniu do tryków z dobrą jakością nasienia. Jednakże zawartość DNA w przeliczeniu na miliard plemników była wyższa w nasieniu patologicznym. pH nasienia dobrej jakości było niższe w porównaniu do nasienia o obniżonych wskaźnikach jego właściwości.

### Dyskusja

Według Manna (1964) zawartość DNA u tryków w przeliczeniu na plemnik wynosi  $3,2 \cdot 10^{-9}$ . Bratanow i współpracownicy (1964) natomiast podają, że w nasieniu tryków jest  $1453 \pm 20,4$  mg% DNA. W naszych badaniach zawartość DNA wahała się średnio od 563,3 w nasieniu patologicznym do 835,1 mg% w nasieniu normalnym. W przeliczeniu zaś

na ilość plemników — od 2,93 w nasieniu normalnym do 4,14 w nasieniu patologicznym. Większa ilość DNA w przeliczeniu na ilość plemników w nasieniu patologicznym wydaje się na pozór zaskakująca, lecz jest to zjawisko w pewnym sensie możliwe do wytłumaczenia. Perez i współpracownicy (1960) podają, że plemniki buhajów z bardzo słabą zdolnością zapładniającą posiadają szeroką granicę zawartości DNA (od 36 do 96%) w porównaniu z diploidalnymi komórkami. Związane jest to z wielką liczbą morfologicznie nienormalnych plemników. Również u potomków takich buhajów można stwierdzić podobne odstępstwa z zawartości DNA w plemnikach. Większość jednakże plemników buhajów z dobrą zdolnością zapładniającą zawiera około 50% DNA w porównaniu z diploidalnymi jądrami komórek somatycznych. Tynecki i współpracownicy (1965) zwracają uwagę, że zawartość DNA zachowuje się względnie proporcjonalnie do ilości plemników w badanej próbce. Dokładność metody jest problematyczna, gdyż takie elementy jak: nabłonki, leukocyty i bakterie wpływają dość wyraźnie na odczyty. Poziom DNA pochodzenia pozaplemnikowego może być również wysoki, szczególnie w stanach zapalnych dróg wyrowadzających i gruczołów płciowych dodatkowych. C. Leuchtenberger i R. Leuchtenberger (1958) stwierdzili związek między niepłodnością mężczyzn oraz buhajów a zawartością DNA w plemnikach. Ilość DNA u niepłodnych mężczyzn i buhajów jest niska, lecz podlega dużym zmianom u pojedynczych osobników.

W świetle przytoczonych poglądów i danych można przypuszczać, że większa ilość DNA w przeliczeniu na ilość plemników w nasieniu patologicznym mogła być wynikiem z jednej strony obranej metody oznaczania DNA, a z drugiej strony pewną zawartością DNA pochodzenia pozaplemnikowego. W badanym nasieniu tryków, charakteryzujących się obniżonymi wskaźnikami, stwierdzono dość duże ilości złuszczonych komórek nabłonka. Badania zaś jąder dwóch tryków wykazały pewne ich stwardnienia oraz zgrubienia najądrzy, co mogło być wynikiem uprzednio przebytych stanów zapalnych. Wyżej wymienione czynniki mogły mieć pewien wpływ na zawartość DNA i na otrzymanie tego rodzaju wyników w nasieniu patologicznym.

Bakarat Ahmed i Abdalla (1958) podają, że średnia koncentracja kwasu askorbinowego w nasieniu tryków rasy Ossimi wynosiła 10,2 mg/100 ml, a u tryków rasy Rahmani 8,4 mg/100 ml. Mann (1964) donosi natomiast, że w nasieniu tryków zawartość kwasu askorbinowego wynosi 5 mg/100 ml. Według Phillipsa i współpracowników (cyt. za Mannem 1964), buhaje o słabej płodności mogą mieć tego kwasu poniżej 2 mg/100 ml, gdy buhaje o dobrej płodności wytwarzają nasienie zawierające 3—8 mg kwasu askorbinowego.

W naszych badaniach stwierdzono znacznie mniejszą ilość kwasu L-askorbinowego u tryków o obniżonych wskaźnikach właściwości nasienia, co może w pełni sugerować na związek między jakością nasienia

a zawartością kwasu L-askorbinowego. Warto nadmienić, że Koets i Michelson (1956) badając współzależność między zawartością kwasu askorbinowego a jakością nasienia człowieka, obserwowali występowanie większej ilości kwasu L-askorbinowego w nasieniu gorszej jakości.

Obniżona zawartość fruktozy u tryków charakteryzujących się słabszym nasieniem nasuwa przypuszczenie zmniejszonej aktywności hormonalnej jąder. Wprawdzie różnica taka mogła być spowodowana indywidualnymi właściwościami tryków. Dlatego też wyciąganie takiego wniosku, nie popartego badaniami na większym materiale, mogłoby być przedwczesne.

Ponieważ obserwacje niniejsze traktujemy jako wstępne, sądzimy że dalsze badania prowadzone w tym kierunku pozwolą na bardziej szczegółowe wyjaśnienie tego zagadnienia.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Barakat M. Z., Ahmed A., Abdalla A. (1958): Bull. Fac. Vet. Med. Cairo Univ. 5, 201.
2. Bratanow K., Iosifow K., Matliewa M., Cekowa E. (1964): Wietierarnomed. nauki 1, 8, 73.
3. Eapen K. J., Nasir Raza M. M. (1963 a): Indian Vet. J. 40, 431.
4. Eapen K. J., Nasir Raza M. M. (1963 b): Indian Vet. J. 40, 559.
5. Eibl K. (1959): Lehrbuch der Rinderbesamung, Berlin—Hamburg.
6. Glick D. (1954): Methods of Biochemical Analysis, New York.
7. Koets P., Michelson L. (1956): Fertility and Sterility 7, 15.
8. Kastyak L. (1965): I Sympozjum Sekcji Niepłodności Pol. Tow. Gin. Lublin 1963, Ref. 37, 229.
9. Leuchtenberger C., Leuchtenberger R. (1958): Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 313, 130.
10. Leuchtenberger C., Leuchtenberger R. (1960): Biochem. Pharmacol. 4, 128.
11. Mann T. (1948): J. Agric. Sci. 38, 323.
12. Mann T. (1964): The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract, London—New York.
13. Meyhöfer W. (1963): Arch. Klin. und Exp. Dermatol. 216, 556.
14. Perez M., Petel J. P., Vendrely C. (1960): C. R. Acad. Sci. 261, 2581.
15. Salisbury G. W. (1960): J. Dairy Sci. 43, 882.
16. Sestina M. R., Norman C. (1964): 5<sup>o</sup> Congr. internaz. riproduz. anim. e fecondaz. artific. Trento 4, 276.
17. Summerhill W. R. Jr., Olds D. (1961): J. Dairy Sci. 44, 548.
18. Tynecki J., Boczkowski Z., Żrubek H., Doraczyński H., Choma M., Robak K. (1965): I Sympozjum Sekcji Niepłodności Pol. Tow. Gin. Lublin 1963, Ref. 39, 241.
19. Welch R. M., Hanly E. W., Guest W. (1961 a): J. Histochem. and Cytochem. 9, 251.
20. Welch R. M., Hanly E. W., Guest W. (1961 b): J. Morphol. 108, 145.

## РЕЗЮМЕ

Семя получили на искусственную вагину от 36 баранов (среди которых 11 имело патологическое семя) и определяли: объём эякулята, подвижность и процент патологических сперматозоидов, содержание фруктозы, аскорбиновой кислоты, ДНК, и pH семени.

Полученные результаты обнаружили, что семя баранов, обладающее пониженной концентрацией и подвижностью сперматозоидов, большим процентом патологических сперматозоидов, имеет пониженное содержание фруктозы, аскорбиновой кислоты и ДНК. Содержание ДНК в пересчёте на количество сперматозоидов было выше в патологическом семени. pH нормального семени было низким (6,7) по сравнению с патологическим (7,4).

## SUMMARY

The semen was taken into artificial vagina from 36 rams (among them, 11 rams possessed diminished quality of semen). Volumen of ejaculate, concentration of spermatozoa, amount of spermatozoa in ejaculate, activity of spermatozoa, percent of pathologic spermatozoa, content of fructose, content of L-ascorbic acid, DNA content and pH of semen were determined. The obtained results demonstrate that the rams semen, characterized by the diminuation of spermatozoa concentration, diminished spermatozoa activity and by great percent of pathologic spermatozoa, possessed minor fructose content, minor content of L-ascorbic acid and DNA. The content of DNA, as calculated to number of spermatozoa was higher in pathologic semen. pH of normal semen is minor (6.7) as compared to pH of pathologic one (7.4).