

W dalszych latach kontynuowano ten kierunek prac w Polsce, a badania poszerzono między innymi o relacje między zagęszczeniem wybranych gatunków zwierząt a różnorodnością środowiska. Ponadto partycypowano w opracowaniu zasad ochrony fauny do Planu Ochrony Poleskiego Parku Narodowego oraz dla czterech parków krajobrazowych.

Funkcjonowanie populacji zwierząt łownych to kolejny kierunek badawczy, który jest prowadzony w sposób ciągły, a badania obejmują przede wszystkim: oceny liczebności, preferencje siedliskowe, struktury populacyjne, waloryzacje środowisk w aspekcie wymagań populacji, zagrożenia dla zwierząt. W tej problematyce testowano metody oceny liczebności zwierząt, w tym lotniczą w Poleskim Parku Narodowym. Porównując wyniki z oceny liczebności zwierząt metodą naziemną (metoda aktywnych tropień) i ze śmigłowca (w zimie) stwierdzono, że wyniki były porównywalne tylko przy redukcji obserwowanej powierzchni. Iglaste i mieszane drzewostany Poleskiego Parku Narodowego nie pozwalały na dostrzeżenie znajdujących się tam zwierząt. Dlatego na podstawie planimetrycznego zapisu filmowego dokonano redukcji powierzchni nie objętej obserwacją. Oceniając zagęszczenie i rozmieszczenie saren w kompleksach leśnych wykazano wyższe zagęszczenia w strefach przybrzeżnych (ekotonowych) niż w głębi dużego kompleksu leśnego (Lasy Janowskie), a także wpływ żyzności siedlisk na zagęszczenie (Lasy Polesia i Wyżyny Lubelskiej).

Ocena liczebności i preferencji siedlisk zajmowanych przez gęsię na Lubelszczyźnie wykazała, że w okresie od 1970 do 1998 roku redukcji uległa zarówno liczebność ptaków (ok. 3-krotnie), jak i zajmowane przez nie siedliska. Gęsię zajmowały 2-7% powierzchni nadleśnictw, preferując drzewostany w fazie dojrzałej i starodrzewia oraz tereny o dużym stopniu uwilgotnienia. W nadleśnictwie Zwierzyniec gęsię występowały aż na 93% powierzchni boru bagiennego. Przyczyny zmniejszania się liczebności gęsi są złożone, a chcąc stwierdzić udatność lęgów wykładano jaja kur w makietach gniazd i obserwowano wielkość zniszczeń i sprawców. Odsetek zniszczonych gniazd w Lasach Janowskich wy-

nosił 75%, a w Nadleśnictwie Szczerba – 55%. Sprawcami zniszczeń były przede wszystkim ssaki drapieżne, krukowate i ludzie, natomiast w prawie 43% przypadków nie udało się ustalić sprawcy zniszczeń.

Badania prowadzone nad rozmieszczeniem bażantów wykazały, że preferują one pobrzeża cieków wodnych, co należy tłumaczyć dobrze rozwiniętymi strefami osłonowymi i bazą pokarmową. W okresie tokowisk przy jednym kogucie występowało od 2 do 4 kur, a liczba wodzonych piskląt malała od 8 na początku czerwca do 3,5 – pod koniec sierpnia.

W ramach grantu koordynowano i realizowano ogólnopolskie badania dotyczące stanu zdrowotnego i zagrożeń bytowania zajęcy. W pięciu rejonach Polski oceniano dynamikę liczebności i wybrane parametry populacyjne. W badaniach genetycznych oceniano genotoksyczny wpływ środowiska, a w badaniach weterynaryjnych (anatomopatologiczne, mikrobiologiczne, parazytologiczne, toksyczne) stopień zagrożenia zdrowotnego. Nie stwierdzono występowania nowej jednostki chorobowej u zajęcy, wpływ innych czynników patogennych też nie miał decydującego znaczenia na dynamikę liczebności, a najbardziej znaczące okazały się zmiany środowiskowe. Część tych badań została wykorzystana w publikacji popularno-naukowej „Przyczyny spadku populacji zajęcy szaraka w Polsce”, wydanej w 2002 r. staraniem Ministerstwa Środowiska oraz Fundacji Ekonomistów Środowiska i Zasobów Naturalnych. Badania roślinności drzewiastej, zjadanej przez łosie w Poleskim Parku Narodowym wykazały, że zwierzęta te konsumowały do 8,5% produkcji pierwotnej tych siedlisk. Stwierdzono zróżnicowanie składu gatunkowego w zależności od pory fenologicznej. Najbardziej preferowane przez łosie były wierzby, lecz najwięcej biomasy dostarczały gatunki drzew iglastych.

Problematyka realizowanych prac w Katedrze Ekologii i Hodowli Zwierząt Łownych jest zróżnicowana, spowodowane jest to zainteresowaniami pracowników, zapotrzebowaniem na dany rodzaj badań i możliwościami ich realizacji.

Immunologiczne przyczyny zaburzeń płodności

Hanna Bis-Wencel

AR w Lublinie

Immunologia reprodukcji jest dziedziną nauki obejmującą reakcje immunologiczne wpływające na gametogenezę, zapłodnienie, embrio- i fetogenezę, jak również zjawiska im towarzyszące. Reakcje immunologiczne dotyczą w szczególności zjawisk autoimmunologicznych, zachodzących w układzie rozrodczym zarówno samic, jak i samców, a polegają na wytwarzaniu przeciwciał, m.in. typu aglutynin, cytotosyn, immobilizyn. Przeciwciała te mogą być skierowane przeciwko izoantygenom plemników u samców, jak również embrionów i płodów w drogach rodnych samicy. Powstają m.in. na skutek stymulacji immunologicznej, braku immunologicznego ha-

mowania, wadliwego wzbudzenia tolerancji immunologicznej czy też immunologicznej bariery pomiędzy matką a płodem [10]. Badania nad autoimmunologicznymi reakcjami w obrębie układu rozrodczego są bardziej zaawansowane w medycynie ludzkiej [5]. U zwierząt również opisano przypadki występowania przeciwciał przeciwko plemnikom, zarówno w surowicy krwi jak i innych płynach ustrojowych. Oznacza to, że liczne frakcje białkowe płynnych składników nasienia oraz elementów komórkowych mają właściwości antygenowe, a więc są w stanie wywołać odpowiedź immunologiczną organizmu przez wytworzenie odpowiednich przeciwciał [3].

Mówiąc o zaburzeniach w rozrodczości należy pamiętać, że przyczyny ich mogą dotyczyć obydwu płci. W żeńskich drogach rodnych reakcje autoimmunologiczne mogą zachodzić zarówno podczas oogenezy, jak i zapłodnienia. U kobiet z bezdzietnych małżeństw stwierdza się metodami immunohistochemicznymi zarówno humoralne, jak i związane z tkankami autoprzeciwciała w wycinkach z jajników oraz endometrium pobranych metodą biopsji. O randze zaburzeń płodności na tle immunologicznym świadczą wyniki badań prowadzone zarówno wśród ludzi, jak i na zwierzętach. Reyes [4] stwierdził u krów z zaburzeniami płodności, że u ok. 22% badanych samic miano przeciwciał, skierowanych przeciwko nasieniu buhajów używanych do rozrodu, było wysokie. Miano spermaglutynin było tym wyższe, im więcej było niesku-

tecznych inseminacji u poszczególnych sztuk, a jednocześnie u samic tych występowało zapalenie błony śluzowej macicy.

Mechanizmy prowadzące do powstawania przeciwciał przeciwplemnikowych nie są do końca poznane. W dużym uproszczeniu schemat odpowiedzi immunologicznej na wprowadzone z nasieniem antygeny można przedstawić następująco: wprowadzone w sposób naturalny lub sztuczny (inseminacja) antygeny ulegają resorpcji na całej długości dróg rodnych i tam są fagocytowane, a następnie prezentowane przez fagocyty limfocytom. Możliwość przedostawania się sfagocytowanych plemników do układu krążenia samicy stwarza niebezpieczeństwo powstawania w organizmie potencjalnej matki izoprzeciwciał. Są one skoncentrowane przede wszystkim we frakcjach gammaglobulin. Przeciwciała klasy IgG i IgM są tu głównymi czynnikami odpowiedzi humoralnej. Immunoglobuliny występujące w układzie krążenia mogą przenikać, w drodze selektywnego transportu lub przesączania, do wydzielin układu rozrodczego, a także do płynu pęcherzyków jajnikowych, skąd podczas owulacji wraz z komórką jajową mogą przedostawać się do jajowodu. Immunoglobuliny IgG i IgM bywają obecne na błonach śluzowych i w wydzielinach dróg rodnych, jednak w tych miejscach dominacją przypada immunoglobulinom klasy IgA lub SIgA, chociaż mogą one również pojawiać się w niewielkich ilościach w płynach ustrojowych [9].

Wchłonięte antygeny mogą stymulować powstanie odpowiedzi miejscowej w resorbującej je śluzówce, mogą także być przeniesione przez krew lub limfę do bardziej odległych tkanek limfoidalnych, wywołując tam odpowiedź immunologiczną. W pierwszym przypadku sekrecyjne SIgA występują w wydzielinie śluzówki dróg rodnych, a głównie szyjki macicy, w drugim zaś przeciwciała te występują zarówno w krwiobiegu, jak i w wydzielinie błon śluzowych układu rozrodczego. Tak zwane zjawisko transsudacji krążących we krwi przeciwciał na błonę śluzową szyjki macicy występuje zarówno po śródskórnej, jak i doszyjkowej immunizacji [9, 10].

W drogach rodnych samicy, miejscem gdzie dochodzi do najintensywniejszego wytwarzania przeciwciał przeciwplemnikowych jest szyjka macicy. Wykazano, że z całego układu rozrodczego liczba plazmacytów jest największa w submukozie szyjki macicy. Ze względu na jej budowę anatomiczną (krótka i wąska) dochodzi do największej koncentracji antygenów zawartych w nasieniu [1]. Tak dzieje się zarówno podczas krycia naturalnego, jak i doszyjkowej inseminacji. Immunologiczny potencjał pochwy, macicy i jajowodów jest znacznie niższy, co prawdopodobnie spowodowane jest funkcją bariery ochronnej szyjki w stosunku do macicy.

Teoretycznie większość samic jest niezgodna tkankowo ze swym partnerem, co zwiększa ryzyko powstania przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom plemników i nasienia. Żeńskie komórki immunokompetentne, spotykając się z antygenami zawartymi w nasieniu podlegają również wpływom inhibitora produkowanego w dodatkowych gruczołach płciowych. Zostało to potwierdzone testem transformacji limfocytów. Ponieważ efekty działania inhibitora nie są specyficzne dla gatunku, stąd podejmowane są próby wywołania supresji, poprzez dodanie go do nasienia samców innych gatunków i uzyskanie zapłodnienia. Sugeruje się, że przeciwciała mogą być jednym z elementów selekcji plemników w żeńskich drogach rodnych. Antygeny nasienia mogą też być powodem uczynienia mechanizmów odporności komórkowej, co wykazano u samic myszy, jako skutek kontaktu poprzez krycie z izoantygenami samczymi [3].

U 17% kobiet z niewyjaśnioną niepłodnością stwierdzono obecność spermimmobilizyn, skierowanych przeciwko swois-

tym antygenom osocza nasienia. Nie stwierdzono ich natomiast u kobiet ciężarnych i niezamężnych. Badania z tego samego zakresu przeprowadzono też u bydła i świńek morskich, po immunizacji tkanką jąder i nasieniem. Surowice te hamowały zapłodnienie komórek jajowych. Badania przeprowadzone na królikach wykazały u samic immunizowanych frakcjami nasienia zmniejszenie liczby plemników w interakcji z komórkami jajowymi, zahamowanie aktywności hialuronidazy, wysokie miana aglutynacyjne i immobilizacyjne oraz prawie całkowity zanik płodności [3].

Oceniając wpływ surowic o wysokim mianie przeciwciał antyplemnikowych na ruchliwość plemników tryka wykazano, że obniżyła się ona pod wpływem surowic pochodzących od krów inseminowanych nieskutecznie oraz surowicy dodatniej króliczej, w porównaniu z surowicą normalną bydłą i króliczą. Strzeżek i wsp. [6] badali za pomocą testu makroaglutynacji Kibricka surowice krów: zacielenych po pierwszej inseminacji, kilkakrotnie nieskutecznie unasienianych i jałówek. Wykazali odpowiednie miana: 1:45, 1:914, 1:12. Wysokie miana dotyczyły nasienia tego buhaja, którym krowy były uprzednio inseminowane, a więc po wielokrotnej inseminacji i dodatkowo najwyższe średnie miano wykazano u krów z zapaleniem błony śluzowej macicy. Sugeruje się, że uszkodzenie bariery nabłonkowej endometrium sprzyja wnikaniu antygenów nasiennych i powstawaniu przeciwciał [7, 11].

Kolejny problem wynika z dużego rozrzedzenia plazmy nasienia, jakie występuje przy produkcji nasienia mrożonego. Powoduje to zmniejszenie aktywności inhibitora odpowiedzi immunologicznej, lub jego zanik, i zmniejsza prawdopodobieństwo skutecznej ochrony plemników przed reakcjami systemu odpornościowego samicy. Zbyt wczesne krycie po porodzie, krycie przy istniejącym stanie zapalnym endometrium, ułatwiają wnikanie zawartych w nasieniu antygenów. Podobny efekt może być wynikiem zbyt późnego unasieniania w czasie rui lub poza rują [1, 2].

Znając etiologię i patogenezę zaburzeń płodności na tle immunologicznym należy podjąć działania zapobiegające. W sposób naturalny spadek miana przeciwciał następuje wraz z wydłużaniem się czasu braku kontaktu z antygenami obecnymi w nasieniu. Sposób ten jest z dużym powodzeniem stosowany w medycynie ludzkiej (pozbawiony aspektu ekonomicznego), u zwierząt zaś, np. w przypadku krów, utrzymanie prawidłowej płodności jest jednym z podstawowych warunków ekonomicznej opłacalności chowu i hodowli, a jej podstawowym wyznacznikiem jest urodzenie w ciągu 365 dni żywego i zdolnego do dalszego życia potomstwa. Cięża ponadto umożliwia regenerację gruczołu mlekowego i odnowienie laktacji. U bydła istnieje możliwość ominięcia miejsca największej koncentracji spermaglutynin, jakim jest szyjka macicy, poprzez unasienianie domaciczne [12]. Metodę tą stosuje się również w medycynie ludzkiej, ale istnieje niebezpieczeństwo wprowadzenia drobnoustrojów patogennych bezpośrednio do macicy, gdzie potencjał immunologiczny jest niski.

Istnieją też doniesienia o próbach dodawania do nasienia inhibitora odpowiedzi immunologicznej, zawartego w plazmie nasienia, a pozyskanego w znacznej ilości z nasienia knura.

Z badań przeprowadzonych w Klinice Rozrodu Zwierząt AR w Lublinie ustalono, że przeciwciała przeciwplemnikowe skierowane są głównie przeciwko plemnikom tej rasy buhajów, których nasieniem samice były wcześniej unasieniane. Przy pomocy testów laboratoryjnych można ustalić rasę samca, w przypadku której miano spermaglutynin jest najniższe i gwarantuje możliwość dotarcia plemników do komórki jajowej [12].

W medycynie ludzkiej wykorzystuje się również dodawanie związków immunosupresyjnych, np. kortykosterydów, do nasienia w celu osłabienia mechanizmu blokowania plemników w drogach rodnych, ale uzyskane wyniki nie są jednoznacznie pozytywne. U ludzi w przypadku zaburzeń płodności o podłożu immunologicznym najczęściej stosowany jest pełny test inwazyjny w połączeniu z testem postkoitalnym. Do badania tego, oprócz nasienia i śluzu badanej pary, używa się nasienia płodnego mężczyzny i śluzu płodnej kobiety [5, 8].

U zwierząt najprostszym testem jest test penetracji plemników w śluzie szyjkowym pobranym podczas rui. Jest to metoda paraimmunologiczna, pozwalająca na postawienie diagnozy. Polega na ocenie szybkości przemieszczania się plemników w śluzie szyjkowym. Brak penetracji śluzu przez plemniki lub ich słaba penetracja świadczą o niemożliwości dojścia do komórki jajowej i zapłodnienia. Testem komplementarnym, pozwalającym na wykrycie sprawcy zahamowania ruchu plemników w śluzie szyjkowym, tj. spermaglutynin, jest test mikroaglutynacji plemników z zastosowaniem surowicy krwi i żywych plemników. Do dokładnej lokalizacji przeciwciał osiadłych można stosować technikę pośredniej immunofluorescencji, a także opracowywane są metody immunoenzymatyczne.

Kolejnym aspektem niepłodności, na tle immunologicznym, jest tolerancja immunologiczna systemu odpornościowego matki dla zapłodnionej komórki jajowej. Połowa materiału genetycznego rozwijającego się zarodka pochodząca od samca jest immunologicznie obca organizmowi matki. Właściwości antygenowe materiału genetycznego ojca w początkowym okresie okrywa osłonka przejrzysta. Po jej zaniku na powierzchni trofoblastu układają się komórki ze zmniejszoną aktywnością determinant antygenowych. Aby nie doszło, mimo wszystko, do konfliktu z limfocytami matki, w błonie śluzowej macicy i w jej wydzielinie pojawiają się osłaniające przeciwciała, głównie z łańcuchem sekrecyjnym. Przeciwciała te zajmują miejsce antygenowe na zarodku, a więc opłaszczają go ochronnie, nie dając możliwości limfocytom do ich działania cytotoksycznego [2].

Wcześniej poglądy na układ rozrodczy samicy traktowały macicę jako miejsce immunologicznie uprzywilejowane. Dopiero domaciczne wszczepienie transplantantów skóry, które zostały odrzucone, zmieniło pogląd na to zagadnienie. Ochrona embrionu jest prawdopodobnie uwarunkowana przez otaczające łożysko, a nie przez macicę. Faktem jest, że po implantacji zarodka trofoblast zostaje okryty bardziej lub mniej ciągłą warstwą fibrynoideu. Potwierdziły to doświadczenia na myszach. Gdy nieuszkodzone blastocysty myszy zostały przeniesione do zwierząt obcego szczepu, nie nastąpiła reakcja immunologiczna. Jednak, gdy przed przeniesieniem została usunięta warstwa fibrynoideu, w wyniku zastosowania neuramidazy, to samice doświadczały zareagowały natychmiastowym wytworzeniem przeciwciał, a płody zostały odrzucone. Przyjmuje się, że gruba warstwa błony śluzowej macicy w czasie ciąży (doczesna) wokół płodu działa jako swego rodzaju bariera immunologiczna. Allotransplantat jest zwykle w wyniku reakcji odpornościowych hamowany w swoim wzroście i następnie odrzucany. Jeżeli natomiast przed transplantacją nastąpi aktywna immunizacja połączona z wytworzeniem przeciwciał, to w większości przypadków nie dochodzi do hamowania wzrostu transplantatu. Zjawisko to określane jest jako immunologiczne wzmocnienie (enhancement). W jego przypadku chodzi o formę immunologicznej indukcji tolerancji, która w przeciwieństwie do immunosupresji stanowi specyficzną reakcję na określone antygeny. Dla ochrony płodu przed immunologicznym systemem matki ma to o tyle znaczenie, że obok niespecyficznym czynników, które

zmieniają podczas ciąży reaktywność limfocytów T, dodatkowo jeszcze przeciwciała blokują reakcję na antygeny ojca, a szczególnie przeciwciała przeciwko antygenom HLA. Określa się je jako protective or blocking antibody, a należą one do frakcji immunoglobulin IgG. Ponadto wyizolowano z łożyska szczura frakcję glikoprotein o działaniu immunosupresyjnym. Substancje te mogą podczas ciąży odgrywać pewną rolę przy „odczytaniu” odpowiedzi immunologicznej w kierunku preferowania produkcji komórek osłaniających transplantacyjne antygeny ojca. Te czynniki regulujące odporność związane są z błoną komórkową i uwalniane do krwioobiegu, gdzie indukują działania systemowe. Istnieje hipoteza, że sygnałem tej przemiany jest sam zarodek, który modyfikuje przemiany od reakcji odrzucania do dominującej reakcji sprzyjającej [2, 9].

Spośród humoralnych czynników, które zapewniają tolerowanie płodu i łożyska w organizmie matki, wykryto w ostatnich latach cały szereg protein, które spotyka się przede wszystkim w obszarze alfa- i betaglobulin. Ich immunosupresyjne działanie polega na blokowaniu przechowywanej przez komórki pamięci immunologicznej. Substancje te wytwarzane są przez endometrium i łożysko oraz przez płód. Szczególnie ciekawy jest wczesny czynnik ciążyowy (early pregnancy factor). Białko to pojawia się już kilka godzin po zapłodnieniu. Aktywność ta związana jest ściśle u wszystkich gatunków z ciążą i stanowi najwcześniejszy wskaźnik zarówno zapłodnienia, jak i śmierci zarodka. Jak wynika z badań prowadzonych *in vitro* i *in vivo* pełni on funkcję regulacji odporności, przede wszystkim w fazie preimplantacji [2, 3, 6].

W naturalnych warunkach nawet jednorazowy kontakt organizmu samicy z nasieniem powoduje uczulenie jej układu immunologicznego za pośrednictwem limfocytów T. Prawdopodobnie pozwala to na późniejsze rozpoznawanie antygenów nasiennych i uruchomienie specjalnych mechanizmów obronnych, umożliwiających bezpieczne przejście plemników przez drogi rodne. Nasienie, które jest dla organizmu samicy elementem obcym – antygenem, podlega działaniu jej naturalnych czynników obronnych. Aby możliwe było zapłodnienie i podtrzymanie gatunku muszą zostać wytworzone warunki dla przeżycia plemników w nowym środowisku, a następnie ochrona rozwijającego się zarodka. W tym celu uruchamiane zostają mechanizmy hamujące działanie układu odpornościowego samicy i to zjawisko nazywamy immunosupresją. Właściwości immunosupresyjne ma plazma nasienia, jak również wydzieliny układu rozrodczego samicy. Następnie dochodzi do proliferacji pobudzonych antygenami komórek i powstania klonów aktywnych limfocytów, kompetentnych dla powstania odpowiedzi humoralnej (komórki plazmatyczne).

Reasumując można stwierdzić, że zjawiska immunologiczne towarzyszą powstawaniu nowego życia od momentu wprowadzenia plemników w drogi rodne samicy aż do końca ciąży i są nieodłącznym warunkiem jego rozwoju.

Literatura: Bielański W., 1979 – Rozród zwierząt. PWRiL, Warszawa. 2. Krzymowski T., 1995 – Fizjologia zwierząt. PWRiL, Warszawa. 3. Max A., 1991 – Przegląd Hodowlany 1, 29. 4. Reyes M.P., 1978 – Evaluation of antibodies response against semen in infertile cows. Proc. 4th Symp. Immunol. Reprod., Varna 1978, 383-386. 5. Stern I., Dixon P.M., Manganiello P.D., Brinck-Johnsen T., 1992 – Fert. Steril. 58, 950. 6. Strzeżek J., Bucko T., Jastak Z., 1973 – Medycyna Weterynaryjna 29, 236. 7. Strzeżek J., 1974 – Zesz. Nauk. ART Olsztyn, Zoot. 7, 1. 8. Ulcova-Gallova Z., Mraz Z., Planickova E., Macku F., Ulc I., 1988 – Int. J. Fert. 33, 421. 9. Wrona Z., 1994 – Ann. UMCS, Sec. DD, 4, 27-36. 10. Wrona Z., 1995 – Ann. UMCS, Sec. DD, 3, 21-44. 11. Wrona Z., 1995 – Ann. UMCS, Sec. DD, 4, 45-60. 12. Wrona Z., 1995 – Ann. UMCS, Sec. DD, 5, 61-70.