

PRACA
DOKTORSKA

Akademia Techniczno-Rolnicza
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich
w Bydgoszczy

**Dynamika zmian wybranych cech morfologicznych
i biochemicznych nasienia lisa polarnego *Alopex lagopus*
w sezonie rozrodczym**

Karolina Stasiak

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. inż. Bogdana Janickiego
w Katedrze Biologii Małych Przeżuwaczy
i Biochemii Środowiska

Biblioteka Główna UTP w Bydgoszczy



000000136239

Bydgoszcz 2006

Wydawnictwo Naukowe PWN
ul. Chałubińskiego 1
00-900 Warszawa

Instytut Technologiczno-Przyrodniczy
i Biblioteczny Instytut Inżynierii i
Wzrostu



D 337

Instytut Technologiczno-Przyrodniczy

Instytut Technologiczno-Przyrodniczy
i Biblioteczny Instytut Inżynierii i
Wzrostu

Instytut Technologiczno-Przyrodniczy

08 D 137/3

*Składam serdeczne podziękowania
prof. dr hab. Bogdanowi Janickiemu
za pomoc w napisaniu niniejszej pracy*

*Koleżankom z Katedry
za cenne wskazówki, nieocenioną pomoc
i słowa otuchy przy pisaniu niniejszej pracy*

serdecznie dziękuję

SPIIS TREŚCI

1. WSTĘP	4
2. CEL PRACY	6
3. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	7
3.1. Charakterystyka lisa polarnego <i>Alopex lagopus</i>	7
3.2. Pobieranie nasienia	8
3.3. Konserwacja nasienia	9
3.4. Charakterystyka nasienia	10
3.5. Charakterystyka plazmy	14
4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	19
4.1. Materiał badany	19
4.2. Pobieranie prób do analizy	19
4.3. Oznaczenia w pełnym nasieniu	20
4.4. Oznaczenia w plazmie nasienia	22
4.5. Ocena zdolności reprodukcyjnej samców	28
4.6. Analiza statystyczna	28
5. WYNIKI BADAŃ	29
5.1. Charakterystyka podstawowych parametrów jakościowych ejakulatów lisa polarnego <i>Alopex lagopus</i> w sezonie rozrodczym	29
5.2. Korelacje między wybranymi parametrami jakości nasienia lisa polarnego <i>Alopex lagopus</i>	40
5.3. Profile elektroforetyczne białek plazmy nasienia	44
5.4. Rozdział elektroforetyczny form molekularnych inhibitora trypsyny	52
5.5. Wyniki rozrodu	57
6. DYSKUSJA WYNIKÓW	58
7. WNIOSKI	68
8. PIŚMIENNICTWO	69
9. ZAŁĄCZNIK	78

1. WSTĘP

Hodowla zwierząt futerkowych jest stosunkowo młodą dziedziną, liczącą nieco ponad 100 lat. Pierwsze fermy lisa polarnego pojawiły się pod koniec XIX wieku w Ameryce Północnej, natomiast w Polsce, rozwój fermowej hodowli tego gatunku nastąpił po II wojnie światowej wraz z importem zwierząt hodowlanych ze Skandynawii (Wierzbicki 2005). Prawdziwy rozkwit tego sektora hodowli nastąpił w latach 80. i 90. Wówczas, zarówno państwo jak i hodowcy osiągnęli duże dochody. Następne lata przyniosły ogromne zmiany w tej gałęzi produkcji. Przejście na gospodarkę wolnorynkową i co kilka lub kilkanaście lat powtarzająca się nadprodukcja skór futrzarskich oraz działania „ekologów” doprowadziły do upadku większości ferm. Pogłowie lisów polarnych zmniejszyło się o około 60% (Szeleszczuk i in. 2004).

Konkurencja na światowych rynkach skór zwierząt futerkowych zmusiła pozostałych hodowców do przyspieszenia postępu hodowlanego, a co za tym idzie do zaostrzenia selekcji i wymiany najlepszych zwierząt między fermami. W efekcie, hodowcy nie tylko muszą produkować skóry o dobrej jakości ale też muszą szybko reagować na ciągle zmieniające się wymagania dotyczące skór. Wykorzystanie nowoczesnych metod biotechnologicznych, do których zalicza się zabieg unasienniania, pozwala na szybkie wprowadzenie tych zmian (Szeleszczuk 2003).

W ostatnich latach także i w Polsce zabieg inseminacji wzbudza coraz większe zainteresowanie. Korzyści płynące z zastosowania inseminacji są bardzo szerokie. Dzięki niej możemy maksymalnie wykorzystać nasienie i ogromne możliwości najlepszych zwierząt, zapładniając nasieniem uzyskanym od jednego samca nawet 60 samic. Stosując inseminację, jako jedną z metod rozrodu, pojawiła się możliwość tworzenia mieszańców między gatunkami i między odmianami na skalę niemożliwą do osiągnięcia przy kryciu naturalnym (Lorek i in. 1999; Valtonen 1991). Łatwiej jest również uzyskać postęp w pracy hodowlanej, dzięki dokładniejszej i szybszej ocenie wartości hodowlanej oraz genetycznej zwierząt (Szeleszczuk 1999).

Zabieg sztucznego unasienniania, przeprowadzony z użyciem świeżego lub zamrożonego/rozrożonego nasienia to częsty temat prac badawczych zarówno w Polsce jak i za granicą (Zalewski i in. 1984; Farstad i in. 1992; Fougner 1989).

Jedną z czynności poprzedzających proces unasieniania jest wybranie płodnego samca - rozplodnika, od którego pobiera się i poddaje ocenie nasienie. Płodność samca zależy od działania wielu czynników egzo i endogennych, a niektóre z nich mogą powodować zaburzenia procesów spermatogenezy i spermogenezy. W efekcie dochodzi do przejściowego lub trwałego obniżenia wartości biologicznej nasienia, a co za tym idzie, jego zdolności zapładniającej. Dlatego też, kompleksowa ocena nasienia samca wybranego do rozplodu może mieć pozytywny wpływ na wyniki rozrodu, a także pozwoli na lepsze wykorzystanie najlepszych jakościowo ejakulatów w warunkach hodowlanych.

Ocena jakości nasienia nie powinna ograniczać się do określanych rutynowo takich parametrów jak koncentracja, odsetek plemników ruchliwych i rodzaj ich ruchu, a winna być poszerzona o badanie morfologii plemników oraz o kompleksową ocenę wpływu wielu czynników wpływających na zmienność jego wyznaczników jakościowych i wartość biologiczną (Bronicka i Dembiński 1999).

2. CEL PRACY

Celem podjętych badań było:

- oznaczenie podstawowych wyznaczników jakości nasienia lisa polarnego *Alopex lagopus* (koncentracja plemników, pH i objętość ejakulatu, morfologia)
- oznaczenie wybranych parametrów biochemicznych (zawartość białka ogólnego, aktywność fosfatazy kwaśnej i alkalicznej oraz aktywność inhibitora trypsyny) w plazmie nasienia
- prześledzenie dynamiki zmian, jakim wybrane parametry jakościowe i wyznaczniki biochemiczne nasienia lisa polarnego podlegają, w czasie całego sezonu rozrodczego
- wykazanie ewentualnych zależności między analizowanymi wyznacznikami
- sprawdzenie obecności enzymów proteolitycznych oraz poznanie składu białkowego plazmy nasienia z wykorzystaniem metod elektroforetycznych.

3. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

3.1. Charakterystyka lisa polarnego *Alopex lagopus*

Grupę mięsożernych zwierząt futerkowych, hodowanych systemem fermowym reprezentują lisy. Popularne są dwa gatunki: lis pospolity *Vulpes vulpes* i lis polarny *Alopex lagopus* zwany inaczej piesakiem. W porównaniu z lisem pospolitym, *Alopex lagopus* cechuje się krępą budową ciała oraz gęstą, bardziej delikatną i wyrównaną topograficznie okrywą włosową (Jarosz 1993). Dlatego też, lis polarny jest jednym z gatunków zwierząt futerkowych o największym znaczeniu dla producentów skór.



Ryc. 1. Lis polarny *Alopex lagopus*

Miejsce lisa polarnego w systematyce zwierząt:

Królestwo:	Zwierzęta	<i>Animalia</i>
Typ:	Strunowce	<i>Chordata</i>
Podtyp:	Kręgowce	<i>Vertebrata</i>
Gromada:	Ssaki	<i>Mammalia</i>
Rząd:	Drapieżne	<i>Carnivora</i>
Rodzina:	Psowate	<i>Canidae</i>
Gatunek:	lis polarny	<i>Alopex lagopus</i>

Lis polarny należy do zwierząt monoestralnych (Farstad 2000), rozmnażających się sezonowo (Brzozowski 1995). Dojrzałość płciową osiąga w wieku 10 miesięcy, a wysoką zdolność do rozplodu zachowuje przez okres 7 lat. Po upływie tego czasu płodność i plenność lisów stopniowo obniża się (Jarosz 1993). W związku z monoestralnością lisów, potomstwo od nich uzyskuje się raz w roku (Cholewa 1988). Dlatego tak ważne jest, aby do rozrodu wybierać osobniki zdrowe, których nasienie charakteryzuje się najlepszymi parametrami. Nieodpowiednie jakościowo nasienie może wyeliminować samice z rozrodu w danym roku.

Aktywność płciowa lisów w warunkach naszego kraju jest dość długa. Okres kryć w stadach lisów polarnych zależy od warunków klimatycznych i trwa zazwyczaj od połowy lutego do końca kwietnia (Wierzbicki i in. 2005). Nasilenie pokryć u lisów polarnych przypada w miesiącu marcu (Cholewa 2000; Szeleszczuk 2001).

3.2. Pobieranie nasienia

Nasienie samców lisa można pobrać dwoma sposobami: metodą elektroejakulacji lub metodą manualną. Pierwsza z nich jest metodą skuteczną, łatwiejszą ale o gorszej efektywności, co potwierdzili w swych badaniach: Brzozowski (1984) oraz Madeyska-Lewandowska i Brzozowski (1983). Pozyskane w ten sposób nasienie charakteryzuje się gorszymi parametrami jakości niż nasienie uzyskane metodą manualną (Jarosz i in. 1991). Dlatego też, w praktyce fermowej pobieranie nasienia od lisów odbywa się najczęściej metodą manualną inaczej zwaną metodą masturbacji (Boue i in. 2000; Jarosz 1996; Szeleszczuk 1999). Metoda ta wymaga wcześniejszego przyzwyczajania zwierząt do pobierania tym sposobem, przenoszenia samców do pomieszczeń i umieszczania ich w odpowiednich klatkach (Szeleszczuk 1998).

W celu uzyskania pozytywnych wyników zaleca się aby pobieranie nasienia wykonywała osoba, do której zwierzę jest przyzwyczajone.

Nasienie lisów, podobnie jak psów, jest wydalane w trzech frakcjach różniących się barwą, objętością, zawartością plemników i składem chemicznym. U lisów polarnych pierwsza frakcja, o konsystencji wodnistej i zabarwieniu szarobiałym pochodzi z gruczołów cewki moczowej. Druga frakcja charakteryzuje się białym zabarwieniem i konsystencją mleczno-śmietankową. Natomiast trzecia frakcja o konsystencji wodnistej pochodzi głównie z gruczołu krokowego. Tylko druga frakcja ejakulatu zawiera duże ilości plemników. Objętość bogatej w plemniki zawiesiny waha się od kilku kropli do $1,5 \text{ cm}^3$ (Szeleszczuk 1999).

3.3. Konserwacja nasienia

Najczęściej w praktyce fermowej stosuje się dwie metody konserwacji nasienia lisów. Jedną z nich jest krótkotrwałe przechowywanie nasienia w stanie płynnym, w temperaturze dodatniej, drugą zaś jest głębokie mrożenie nasienia przy użyciu ciekłego azotu tj. w temperaturze -196°C . W ten ostatni sposób można przechowywać nasienie przez dłuższy okres czasu (Jarosz 1996).

Przechowywanie nasienia (konserwacja krótkotrwała) pozwala na jego użycie nawet do dwóch dni po pobraniu. Umożliwia to rozrzedzanie uzyskanych ejakulatów za pomocą odpowiednio dobranych rozcieńczalników. Najczęściej stosowane rozcieńczalniki, stanowiące dla plemników źródło składników odżywczych, zawierają w swym składzie niewielką ilość cukrów (fruktozy, glukozy lub laktozy) i ok. 10-20% żółtka jaja kurzego. Środowisko zbliżone do naturalnego nadaje rozcieńczalnikom dodatek cytrynianu sodu (Szeleszczuk 1999). Takimi właściwościami charakteryzuje się popularny w krajach skandynawskich rozcieńczalnik EDTA o uregulowanej kwasowości. Dzięki niemu, rozrzedzone nasienie przechowywane w temperaturze pokojowej ($16-20^\circ\text{C}$), zachowuje swą zdolność do zapłodnienia przez okres 8-10 godzin (Jarosz 1996).

Konserwacja nasienia lisów metodą głębokiego mrożenia posiada oprócz zalety długotrwałego przechowywania pewną wadę. Otóż podczas procesu schładzania, zamrażania i rozmrażania, na błonie akrosomalnej plemnika mogą tworzyć się mikrouszkodzenia. Defekt ten powoduje „wyciek” na zewnątrz proteolitycznych enzymów odpowiedzialnych za rozpuszczenie osłonki przejrzystej i pokonanie barier komórkowych wokół komórki jajowej (Czeczot i Strzeżek 1986). A to z kolei prowadzi do utrudnień lub nawet uniemożliwia proces zapłodnienia (Strzeżek i Sławeta 1984). Dlatego też, stopień „wycieku” enzymów informuje o nasileniu zmian w procesie starzenia się struktur plemników w czasie przechowywania nasienia, ale również może sugerować o jego zdolności zapładniającej (Strzeżek 1987).

Na polskich fermach najczęściej używanym rozcieńczalnikiem do mrożenia nasienia jest mieszanina: Tris – kwas cytrynowy – fruktoza z 20% dodatkiem żółtka jaja kurzego i 8% dodatkiem glicerolu (Szeleszczuk 1998). Zamiast fruktozy, niektórzy stosują laktozę (Brzozowski 1984), glukozę (Nizański 2004), a nawet galaktozę czy maltozę (Yıldız i in. 2000). Jako, iż niektóre gatunki ssaków mają zbliżone wymagania środowiskowe, stąd użyty rozcieńczalnik może być podobny lub odpowiednio zmodyfikowany (Cardoso i in. 2003; Farstad 1996; Silva i in. 2003).

Do unasienniania samic lisa polarnego kwalifikuje się nasienie o zabarwieniu szaro-białym, swoistym zapachu i koncentracji plemników w drugiej frakcji nasienia takiej, aby po rozrzedzeniu zawierało nie mniej niż 100-150 mln żywych plemników w 1 cm³ (Farstad 2000; Wierzbowski 1996).

3.4. Charakterystyka nasienia

Mianem „pełnego nasienia” określa się zawiesinę plemników w płynnym, dostarczającym im odpowiednich związków odżywczych, środowisku zwanym plazmą nasienia (Mann 1958). Stosunek ilościowy pomiędzy plemnikami a plazmą jest cechą charakterystyczną dla każdego gatunku, podobnie zresztą jak skład chemiczny nasienia. Niejednokrotnie w ejakulatach osobników tego samego gatunku można zauważyć znaczne wahania poszczególnych składników nasienia. Odpowiedzialne za wahania są między innymi sezonowe zmiany poziomu androgenów i intensywność użytkowania rozplodowego samców.

Główną funkcją biologiczną plemników jest przenoszenie materiału genetycznego i uczestniczenie w procesie zapłodnienia komórki jajowej. Miejscem powstawania męskich komórek rozrodczych są jądra. Opuszczające jądra plemniki nie są w pełni dojrzałymi komórkami rozrodczymi, dlatego też przesuwając się przez najądrza zachodzi w nich szereg zmian biochemicznych, strukturalnych i czynnościowych. Dzięki temu procesowi, określanemu mianem dojrzewania, plemniki przyjmują odpowiedni kształt i wielkość charakterystyczną dla danego gatunku (Wierzbowski 1996).

U większości gatunków, dojrzałe plemniki ze względu na obecność witki przyjmują kształt nitkowaty. Ta szczególna postać w znacznym stopniu decyduje o „przepuszczalności” plemnika, czyli łatwości odłączania dużych cząsteczek od struktury plemnika i przechodzenia ich do środowiska pozakomórkowego (Mann 1958).

W typowym, nitkowatym plemniku można wyodrębnić: główkę, wstawkę i witkę. Główka plemnika, pod względem kształtu i rozmiaru, wykazuje gatunkową specyficzność. Zasadniczo można w niej wyróżnić dwie, otoczone błonami plazmatycznymi części: jądro i pokrywający przednią część jądra plemnikowego - akrosom. To właśnie w jądrze znajduje się cały aparat informacji genetycznej, w postaci gęsto upakowanej chromatyny. Z kolei akrosom zawiera szereg enzymów (akrosynę, hialuronidazę, fosfatazę kwaśną) odpowiedzialnych za przenikanie plemnika do jaja podczas procesu zapłodnienia (Wierzbowski 1996). Wstawka łączy się z główką wąskim, podatnym na uszkodzenia odcinkiem. Ten odcinek to szyjka – stanowiąca strefę o bardzo intensywnej ruchliwości podczas poruszania się plemników, ze względu na szczególną zdolność wyginania się. Natomiast rolą wstawki jest decydowanie o intensywności metabolizmu plemnika oraz zaopatrywanie w związki wysokoenergetyczne pozostałe jego części. Ostatni odcinek plemnika nosi nazwę witki i jest strukturą odpowiedzialną za koordynację ruchu plemników (Strzeżek 1988).

Skuteczne zapłodnienie jaja, a co za tym idzie rozpoczęcie ciąży, zależy od stanu plemników znajdujących się w ejakulacie. Dlatego tak ważne jest poznanie jakościowego i ilościowego składu nasienia. Dla hodowców, lekarzy medycyny i weterynarii cenna jest umiejętność określenia kryteriów oceny nasienia. Pomimo wielu lat badań, nie znaleziono pojedynczej cechy diagnostycznej nasienia, która mogłaby posłużyć jako miernik „płodności samca”.

W krajach skandynawskich oceny ejakulatu dokonuje się na podstawie objętości, koncentracji i ruchliwości plemników (Christiansen i in. 1985; Farstad 1998; Fougner 1989). Natomiast w Polsce, w warunkach fermowych takim kryterium jest tylko makroskopowa ocena gęstości nasienia (koncentracji) i ruchliwość plemników określona subiektywną metodą mikroskopową.

Pełna ocena nasienia powinna zatem obejmować ocenę makroskopową i mikroskopową. W skład badań makroskopowych wchodzi: objętość ejakulatu, jego barwa, konsystencja i zapach, a także odczyn pH. Natomiast mianem badań mikroskopowych określa się ruch masy plemników, ich koncentrację, ruchliwość oraz morfologię.

Stężenie jonów wodorowych (pH) nasienia jest cechą specyficzną dla każdego gatunku zwierząt. Nasienie lisa charakteryzuje się odczynem pH w granicach 6,2-6,4 (Mann 1958), podczas gdy nasienie psa ma odczyn od 6,7 do 7,1. Odczyn świeżo wytryśniętego nasienia jest zawsze prawie obojętny. Dopiero w miarę upływu czasu, staje się najpierw zasadowe, a następnie pod wpływem procesu fruktolizy i nagromadzeniu się kwasu mlekowego pH gwałtownie spada. Według Monkiewicza (1995) podwyższenie pH może świadczyć o stanach zapalnych narządu rodowego lub też o niepełnej ejakulacji. Natomiast Mann (1958) uważa, iż nadmierna początkowa zasadowość nasienia niektórych gatunków ssaków towarzyszy małej płodności i odpowiednio dużej ilości plazmy.

Określenie masowego ruchu plemników poprzez ocenę intensywności falowania to kolejny wyznacznik klasyfikujący nasienie. Nasienie o dobrej jakości charakteryzuje się silnym ruchem falowym, natomiast im te ruchy są słabsze lub ledwo zaznaczone tym jego jakość jest gorsza. Podobnie jest z odsetkiem plemników ruchliwych i rodzajem ich ruchu. Za prawidłowy uważa się tylko ruch postępowy bądź torpedowy. Natomiast do nieprawidłowych ruchów plemników, obniżających jakość nasienia, zalicza się m.in. ruch kołowy, zegarowy, czy wsteczny (Bielański 1977).

Najbardziej obiektywnym wskaźnikiem czynności plemnikotwórczej jąder jest koncentracja plemników, określana jako liczba plemników w 1mm^3 nasienia. Ilość, a także wielkość i kształt plemników jest cechą charakterystyczną dla każdego gatunku. Koncentracja plemników w drugiej frakcji nasienia lisów wynosi średnio $1,3\text{ mln/mm}^3$, a liczba plemników w całym ejakulacie około 650 mln, przy częstotliwości pobierania nasienia co drugi lub trzeci dzień (Jarosz 1990).

O zdolności zapładniającej plemników decyduje odpowiedni i nie uszkodzony ich stan strukturalny. Cechy te warunkują przenikanie plemników przez warstwy pokrywające komórkę jajową oraz wnikanie do jaja.

Liczba i rodzaj anomalii (formy niedojrzałe, zdegenerowane lub uszkodzone) plemników w nasieniu ukazuje stopień nieprawidłowości spermatogenezy, a także może stanowić dowód błędów żywieniowych, nadmiernej eksploatacji samca, choroby wywołującej stany gorączkowe, a nawet nieprawidłowej technologii obróbki nasienia (Monkiewicz 1995). Badanie morfologiczne plemników, polegające na określeniu rodzaju anomalii oraz stosunku liczbowego plemników o nieprawidłowej budowie do ogółu plemników, w sposób najbardziej obiektywny pozwala określić wartość nasienia (Barta 1999; Morstin 1996; Mann 1958). Jako kryterium stosuje się klasyfikację zaproponowaną przez Bloma (1981) dzielącą wszystkie anomalie plemników na wady główne i podrzędne. Do wad głównych plemników zalicza się m.in. formy nedorozwinięte, plemniki podwójne, „bezgłowe”, gruszkowate, z kroplą protoplazmy w położeniu bliższym, czy zwinięte w pętle lub ślimaki witki. Wszystkie te nieprawidłowe typy wpływają na obniżenie płodności samców. Natomiast mianem wad podrzędnych określa się inne odchylenia w formach plemników (np. małe lub olbrzymie główki, pojedyncze pętle lub zagięcia na witce, obecność kropli protoplazmatycznej w położeniu dalszym), mające ograniczone znaczenie dla płodności. Odpowiednio wysoki procent plemników z wadami głównymi może stanowić wskazówkę, że w jądrach i najądrzach istnieją jakieś nieprawidłowe stany. Dlatego też, Blom zaleca aby przyjmować 15% wad głównych jako górny limit dla normalnego nasienia.

Często, jako uzupełnienie powyższych analiz przeprowadza się badania wskaźników biochemicznych nasienia. Określa się wówczas aktywność: akrosyny, aminotransferazy asparaginowej, fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, hialuronidazy, dehydrogenazy mleczanowej, a także stężenie kwasu cytrynowego, fruktozy i zawartość białka ogólnego (Strzeżek i Wołos 1986).

3.5. Charakterystyka plazmy

Naturalne środowisko plemników – plazma to mieszanina wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych, do których zalicza się najądrza, nasieniowody, gruczoły pęcherzykowe, gruczoł krokowy oraz gruczoły opuszkowo-cewkowe. Aktywność wydzielnicza tych gruczołów kontrolowana jest przez podstawowy androgen – testosteron. Każdy z tych gruczołów syntetyzuje wydzielinę o charakterystycznym dla siebie składzie chemicznym, przez co ilość i skład chemiczny plazmy jest cechą charakterystyczną dla danego gatunku.

Główną, fizjologiczną funkcją plazmy nasienia jest udział w naturalnym procesie zapłodnienia, poprzez rozcieńczanie zbitej masy gęsto ułożonych plemników i umożliwienie ich transportu. Ponadto plazma wywiera „pobudzający” wpływ na ruchliwość plemników. Ta aktywująca rola polega na występowaniu swoistych substancji w różnych wydzielinach gruczołów dodatkowych. Znajomość pochodzenia poszczególnych składników plazmy u danego gatunku pozwala określić miejsce zaburzeń lub uszkodzeń w układzie rozrodczym samców (Mann 1958).

W nasieniu większości zwierząt najliczniejszą grupę związków organicznych stanowią białka. W zależności od ruchliwości elektroforetycznej, białka plazmy nasienia można podzielić na cztery frakcje: albuminową (stanowiącą 17-22 % ogółu białek), α -globulinową (19-28 %), β -globulinową (34-44 %) i γ -globulinową (11-21 %). Przeważnie są to białka złożone, odpowiedzialne m.in. za zjawisko krzepnięcia nasienia, które następuje w chwilę po jego wytrysku. Uzyskuje się wówczas konsystencję galaretowatą nasienia, które po pewnym czasie ponownie upłynnia się. Oznaczenie poziomu białka stanowi podstawę do uzyskania wstępnych informacji o zawartości enzymów i innych związków białkowych występujących w plazmie nasienia oraz wydzielinie dodatkowych gruczołów płciowych (Szeleszczuk 2003).

Badania aktywności enzymów plazmy nasienia, które są syntetyzowane w jądrach i dodatkowych gruczołach płciowych, mogą dostarczać cennych informacji o ich stanie zdrowotnym i czynnościowym (Borkowski i Strzeżek 1994).

U różnych gatunków zwierząt, miejscem bogatym w enzymy umożliwiające interakcję gamet w czasie zapłodnienia jest akrosom plemnika. To właśnie w nim stwierdzono obecność proteinaz serynowych, tiolowych, arylowych, karboksylowych

oraz metaloproteinaz. Najbardziej poznany, a zarazem najważniejszy enzym brany pod uwagę przy ocenie jakości nasienia należy do proteinaz serynowych – enzymów proteolitycznych mających w swym centrum aktywnym serynę. Tym enzymem jest akrosyna (Čechova 1988). Ten trypsynopodobny, związany z błoną wewnętrzną akrosomu plemnika enzym, bierze bezpośredni udział w procesie zapłodnienia ssaków, poprzez katalizowanie reakcji hydrolitycznego rozpadu osłonki przejrzystej jaja. Istotną rolę w regulacji aktywności akrosyny pełnią obecne w plazmie nasienia inhibitory tego enzymu, zaadsorbowane na zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej plemników. Inhibitory te (dzięki posiadanej dużej zdolności wiązania się z akrosyną lub trypsyną) są naturalnymi antagonistami akrosyny. W przypadku uszkodzenia błon plemnikowych uwalniana akrosyna jest więc trwale wiązana przez te inhibitory. Zawartość ich w plazmie nasienia uzależniona jest od gatunku, a nawet od wieku zwierząt (Strzeżek 1987).

W nienaruszonym akrosomie, akrosyna wraz z naturalnymi inhibitorami oraz z formą zymogenową tzw. proakrosyną stanowi system akrosynowy plemników (Głogowski i in. 1998). W plemnikach ejakulowanych, prawie cała akrosyna występuje w formie nieaktywnej. Dopiero po uszkodzeniu akrosomu czy to w czasie reakcji akrosomowej, czy to pod wpływem niekorzystnych warunków środowiska proakrosyna aktywowana jest do akrosyny (Čechova 1988). Dlatego też, odpowiednia zawartość proakrosyny i akrosyny w plemnikach jest wskaźnikiem stabilności akrosomów i może być wykorzystana jako biochemiczny test w ocenie jakości nasienia konserwowanego (Borkowski i Strzeżek 1994).

W dostępnej literaturze, wiadomości o pozostałych proteinazach obecnych w akrosomie plemnika są przedstawiane w sposób fragmentaryczny. Do mniej poznanych proteinaz o specyficzności trypsynowej można zaliczyć wykryty w plemnikach człowieka system sperminogen-spermina, czy w plemnikach buhaja ninhibinę. SH-proteinazę zaliczaną do grupy proteinaz tiolowych wyizolowano z plemników większości gatunków zwierząt hodowlanych. Natomiast proteinazy karboksylowe zwane inaczej kwaśnymi poznano dzięki wyizolowanej z jąder królika proakrozyminy (Čechova 1988).

Enzymem współdziałającym z akrosyną w procesie hydrolizy kwasu hialuronowego, jest hialuronidaza, również związana z błoną plazmatyczną plemnika. Enzym ten przypuszczalnie bierze udział w modyfikacjach struktury przestrzennej osłony przejrzystej komórki jajowej, uczulając ją w ten sposób na działanie akrosyny.

Uszkodzenie lub zmiana przepuszczalności błon plemnika powoduje „wyciek” tych enzymów do płynu zewnątrzkomórkowego. W efekcie zjawisko to osłabia zdolność zapładniającą plemników, a obniżając tempo wewnątrzkomórkowych przemian energetycznych doprowadza do słabej przeżywalności komórek po rozmrożeniu (Strzeżek i Wołos 1986).

Czułym wskaźnikiem uszkodzenia wstawki plemnika jest uwalnianie enzymów mitochondrialnych, do których zalicza się m.in. aminotransferazę asparaginową (AspAt, AST, GOT). Enzym ten, znalazł szerokie zastosowanie w diagnostyce dzięki stwierdzonej zależności pomiędzy jego aktywnością, a cechami jakości nasienia. Jego wysoka aktywność w plazmie nasienia świadczy o obniżeniu wartości biologicznej plemników, a także wskazuje na zmiany przepuszczalności ich błon plazmatycznych (Bronicka i Dembiński 1999; Niżański i Bielaś 2003). Natomiast według Strzeżka (1987), wysoki poziom aminotransferazy asparaginowej w osoczu nasienia może wskazywać na stopień zaburzeń w układzie mitochondrialnym plemników, odpowiedzialnym za ich aparat ruchu.

Kolejnym enzymem, którego oznaczanie może być istotne w diagnostyce jest fosfataza alkaliczna (optimum pH 9,0), enzym zlokalizowany na błonach komórkowych plemników, w kropli protoplazmatycznej i w plazmie nasienia (Borkowski i Strzeżek 1994). Występująca w plazmie nasienia fosfataza alkaliczna pochodzi głównie z pęcherzyków nasiennych, gdzie uczestniczy w reakcji tworzenia wolnej fruktozy nasienia zużytkowanej następnie w procesie fruktolizy (Strzeżek i Wołos 1986).

Fosfataza kwaśna (optimum pH 5,6-6,0) to szeroko rozpowszechniona fosfohydrolaza w królestwie roślin i zwierząt. Głównym jej źródłem w plazmie nasienia jest wydzielina gruczołu krokowego. W zależności od części plazmy jaką ona stanowi uzyskuje się różne wartości aktywności fosfatazy kwaśnej – charakterystyczne dla nasienia różnych samców. W plemnikach ssaków enzym ten obecny jest w błonach plazmatycznych, a jego uwalnianie z tych struktur może być wskaźnikiem przebiegu reakcji akrosomowej (Salzberger i in. 1992). Wysoką aktywność fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia obserwuje się w przypadku rozwoju tkanki nowotworowej w gruczole krokowym, dlatego enzym ten uważany jest za ważny wskaźnik pozwalający rozpoznać wczesne stadium raka prostaty (Głogowski i in. 1997).

Jedną z cech chemicznych różniących nasienie od innych tkanek i płynów ustrojowych jest występowanie pewnych związków azotowych.

Są to spermidyna, cholina i spermina, mająca pośredni wpływ na powstawanie charakterystycznego dla nasienia zapachu. Związki te, dając pozytywny odczyn w reakcji Florence'a, stanowią podstawę testu stosowanego w medycynie sadowej, służącego do identyfikacji nasienia (Mann 1958). O właściwościach redukujących, kolejnym specyficznym związkiem azotowym plazmy nasienia jest ergotioneina. Jej obecność w nasieniu knura i ogiera, stanowi ochronę systemów enzymatycznych plemnika przed działaniem czynników wiążących grupy tiolowe. Ta ochronna funkcja ważna jest podczas przesuwania się plemników w drogach wyprowadzających u samca oraz w czasie wędrówki w drogach rodnych samicy (Szeleszczuk 2003). Podobnymi właściwościami charakteryzuje się kwas L-askorbinowy występujący w nasieniu człowieka, buhaja i tryka. W przypadku oligospermii (zmniejszenie ilości plemników w nasieniu) ilość ergotioneiny czy kwasu L-askorbinowego ulega gwałtownym zmianom. Dlatego też związki te, mogą służyć jako wskaźniki oceny jakości nasienia (Strzeżek i Wołos 1986).

Cennych informacji o jakości nasienia mogą dostarczyć również składniki chemiczne plazmy, do których zalicza się m.in. kwas cytrynowy, fruktozę czy składniki mineralne.

W plazmie nasienia zwierząt, podstawowym cukrem jest fruktoza, spełniająca istotną funkcję w metabolizmie plemników. Cukier ten jest podstawowym substratem przemian energetycznych plemników. Jego synteza odbywa się w gruczołach pęcherzykowych z glukozy krwi bądź glikogenu, umiejscowionego w tkance gruczołów pęcherzykowych. Uzyskana fruktoza rozpadając się uwalnia część energii w postaci ATP. Dzięki temu procesowi, plemniki magazynują energię, aby ją później przekształcić w formę zdolną wpłynąć na aparat ruchu (Strzeżek i Wołos 1986). Zatem aktualny poziom fruktozy w plazmie nasienia jest wynikiem równowagi pomiędzy jej dopływem z komórek narządu płciowego, a zużyciem przez plemniki. Podwyższony poziom fruktozy może świadczyć o zwiększonej jej produkcji lub też o zmniejszonym jej wykorzystaniu przez plemniki na skutek utraty przez nie żywotności.

Kolejnym wskaźnikiem plazmy nasienia jest kwas cytrynowy, syntetyzowany głównie przez gruczoły pęcherzykowe i gruczoł krokowy (u człowieka). U niektórych gatunków zwierząt (buhaj, knur, tryk), kwas ten spełnia funkcję głównego buforu nasienia (Strzeżek i Wołos 1986).

Ponadto kwas cytrynowy uważa się za bardzo dobry materiał energetyczny, z uwagi na łatwość jego utleniania w plemnikach w cyklu Krebsa. Zarówno fruktoza jak i kwas cytrynowy są to substancje, których syntezę kontroluje testosteron, dlatego ich zawartość w plazmie może być wskaźnikiem aktywności androgennej jąder (Mann 1958). Dzięki temu można określić dojrzałość płciową samców.

Ważną funkcję w plazmie nasienia pełnią również składniki mineralne, których rolą jest regulowanie różnych procesów enzymatycznych i decydowanie o ciśnieniu osmotycznym.

Trudno jest jednoznacznie określić, który z wyżej wymienionych parametrów biochemicznych ma istotne znaczenie przy ocenie jakości nasienia. Niewątpliwie podstawowe badania parametrów jakości i ilości nasienia powinny być uzupełnione dodatkowymi oznaczeniami biochemicznymi (Borkowski i Strzeżek 1994).

4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

4.1. Materiał badany

Badania eksperymentalne stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono w roku 2003 za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 24/2001. Materiałem badawczym było nasienie pobrane od osiemnastu lisów polarnych *Alopex lagopus* pochodzących z fermy zwierząt futerkowych w Łachowie k. Szubina w województwie kujawsko-pomorskim. Próbkę nasienia pozyskiwano od samców metodą manualną przez cały okres wzmożonej aktywności płciowej tj. od 24 lutego do 30 kwietnia 2003 roku, czyli siedmiokrotnie w odstępach 10-12 dniowych. Ogółem uzyskano 126 ejakulatów.

Analiza makroskopowa i mikroskopowa nasienia została wykonana w Laboratorium Biochemicznym Katedry Biologii Małych Przeżuwaczy i Biochemii Środowiska na Wydziale Zootechnicznym ATR w Bydgoszczy, natomiast aktywność wybranych enzymów w plazmie nasienia oznaczono w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

4.2. Pobranie prób do analizy

Próbki nasienia pobrano od osiemnastu jednorocznych, losowo wybranych osobników *Alopex lagopus*, nie mających jeszcze doświadczenia w kryciu naturalnym. W tym celu, wybrane samce umieszczono w specjalnym poskromie i stosując metodę manualną (masturbacji) pobrano do lejkowatego zbiornika frakcję bogatą w plemniki (Szeleszczuk 1999). Pozyskane nasienie umieszczano w sterylnych, szczelnie zamykanych, plastikowych pojemnikach typu eppendorf i przywieziono, zachowując temperaturę 36-37°C (Brzozowski 1984), do laboratorium celem dalszych badań.

4.3. Oznaczenia w pełnym nasieniu

W uzyskanym materiale przeprowadzono następujące badania:

- określono barwę ejakulatów i konsystencję,
- zmierzono objętość,
- obliczono koncentrację plemników,
- zmierzono odczyn świeżego nasienia (pH),
- policzono udział plemników prawidłowych i ze zmianami w budowie (morfologia).

➤ Barwa i konsystencja ejakulatów

Powyższe cechy nasienia określono za pomocą zmysłu wzroku stosując następującą skalę:

- barwa: biała, żółta;
- konsystencja: wodnista, mleczna (Brzozowski 1984).

➤ Objętość ejakulatów

Objętość uzyskanych próbek nasienia zmierzono za pomocą wyskalowanych naczynek i wykalibrowanych pipet automatycznych, z dokładnością do 0,01 ml.

➤ Koncentracja plemników

Aby obliczyć ilość plemników w ejakulacie skorzystano z komory Bürkera (hemocytometru) i mikroskopu z kontrastem fazowym. W tym celu nasienia rozcieńczono solą fizjologiczną w stosunku 1:200. Wprowadzono kroplę wymieszanego roztworu do hemocytometru, odczekano 3-5 minut i rozpoczęto odliczanie.

Plemniki liczono w 10 dużych kwadracikach, ułożonych na przekątnej siatki. Brano pod uwagę tylko główki plemników znajdujące się wewnątrz dużego kwadracika oraz leżące na lewej i dolnej ograniczającej linii wewnętrznej.

Sposób obliczania koncentracji:

- powierzchnia 1 dużego kwadratu = $1/25 \text{ mm}^2$
- głębokość = $1/10 \text{ mm}$
- objętość = $1/250 \text{ mm}^3$
- stopień rozrzedzenia nasienia = $1/200$
- objętość x rozrzedzenie = $1/50\,000 \text{ mm}^3$.

Średnią ilość plemników, policzonych w jednym dużym kwadracie, podzielono przez 20 (uwzględniając ilość małych kwadratów) i pomnożono przez 50 000. Uzyskana liczba to ilość plemników w 1 mm^3 .

➤ Odczyn świeżego nasienia (pH)

Pomiaru pH dokonano przy użyciu papierka wskaźnikowego (Monkiewicz 1995).

➤ Morfologia plemników

Badanie morfologiczne plemników poprzedzone jest sporządzeniem i barwieniem rozmazów nasienia. Dopiero po ich otrzymaniu można liczyć prawidłowe i zmienione formy plemników.

Sporządzanie rozmazów

Preparaty do badania morfologicznego przygotowano z nasienia świeżego, bezpośrednio po pobraniu. Z każdej pobranej próbki nasienia wykonano dwa preparaty.

Barwienie rozmazów (metoda bydgoska)

Otrzymane preparaty barwiono fioletem goryczki. Jest to metoda obowiązująca w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Bydgoszczy. Stąd jej druga nazwa - metoda bydgoska.

Mając rozmazy wysuszone w temperaturze pokojowej utrwala się je poprzez zanurzenie w 96% alkoholu etylowym na okres 5 minut. Po tym czasie, utrwalony preparat dokładnie wypłukano w strumieniu wody wodociągowej. Następnie zanurzono preparaty na 1 minutę w roztworze eozyny niebieskiej. Wypłukane potem preparaty w wodzie wodociągowej zanurzono w barwniku gencjanowym na okres 3 minut. Po upływie tego czasu wypłukano w wodzie destylowanej i pozostawiono do osuszenia (Bielański 1977).

Tak przygotowane preparaty badano pod mikroskopem fazowo-kontrastowym, licząc prawidłowe i zmienione formy plemników stosując kryteria określone przez Blooma (1981). Z każdego uzyskanego preparatu obejrzano i poddano ocenie 150 plemników.

4.4. Oznaczenia w plazmie nasienia

Plazmy nasienia uzyskano wirując poszczególne ejakulatory przez 10 minut przy 8000x g w temperaturze pokojowej (około 18°C) i do czasu analiz przechowywano w temperaturze - 18°C. W plazmie nasienia oznaczano następujące parametry biochemiczne: białko ogólne, aktywność fosfatazy kwaśnej i alkalicznej. Określono także aktywność inhibitorów akrosyny na podstawie hamowania aktywności trypsyny, a także profile elektroforetyczne ich form.

➤ Ilościowe oznaczenie białek metodą Lowry'ego

W metodzie opracowanej przez Lowry'ego i in. (1951) wykorzystano dwie różne reakcje:

- reakcję aminokwasów aromatycznych z odczynnikiem Folina,
- reakcję jonów miedzi z wiązaniem peptydowymi tzw. reakcja biuretowa.

Badane próby przygotowano do pomiarów, dokonując za pomocą 0,85% roztworu chlorku sodu, odpowiednich rozcieńczeń plazmy (1000x). Zmierzono absorbancję przy długości fali 750 nm, a następnie odczytano stężenie białek w próbach, z krzywej wzorcowej sporządzonej ze znanych stężeń albuminy wołowej.

➤ Oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej metodą Bessey'a, Lowry'ego i Brocka (Bessey i in. 1946)

Fosfataza alkaliczna w obecności jonów magnezu hydrolizuje p-nitrofenylofosforan disodowy do ortofosforanu i p-nitrofenolu. Ten ostatni, w środowisku zasadowym zachowuje się jak wskaźnik – dając żółte zabarwienie roztworu. Intensywność zabarwienia i aktywność enzymu to wielkości do siebie wprost proporcjonalne.

W celu oznaczenia aktywności fosfatazy alkalicznej uzyskaną plazmę rozcieńczono 500x roztworem chlorku sodu o stężeniu 0,85%. Dokonano pomiaru ekstynkcji względem próby zerowej przy długości fali 410 nm, wykorzystując aparat Spekol 11 (Carl Zeiss Jena). Odczytano aktywność enzymu z krzywej wzorcowej, uwzględniono rozcieńczenia i wyliczono aktywność fosfatazy alkalicznej. Uzyskane wielkości przeliczono na jednostki międzynarodowe (J), tzn. liczbę $\mu\text{moli p-nitrofenolu/min/1000 cm}^3$, stosując współczynnik przeliczeniowy 16,67.

➤ Oznaczanie aktywności fosfatazy kwaśnej metodą Bessey'a, Lowry'ego i Brocka (Bessey i in. 1946)

Zasada oznaczania aktywności fosfatazy kwaśnej podobna jest do sposobu oznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej. Obie metody różnią się stosowanym rodzajem buforu.

W celu wyliczenia aktywności fosfatazy kwaśnej należało: przygotować próbki, dokonać pomiaru ekstynkcji przy długości fali 410 nm (korzystając z aparatu Spekol 11), odczytać aktywność enzymów z krzywej wzorcowej i uwzględnić rozcieńczenia badanej plazmy (rozcieńczenie 5x). Uzyskane wielkości przeliczono na jednostki międzynarodowe (J), tzn. liczbę $\mu\text{mol p-nitrofenolu/min/1000 cm}^3$, stosując współczynnik przeliczeniowy 16,67.

➤ Oznaczanie inhibitora metodą spektrofotometryczną

Oznaczanie inhibitora znajdującego się w plazmie nasienia wykonano w kuwetach polistyrenowych, za pomocą spektrofotometru firmy Beckman (lampa vis, faktor 980,50).

Pierwszą czynnością było przygotowanie roztworu trypsyny. W tym celu rozpuszczono ok. 6 mg trypsyny wołowej w 300 cm^3 buforu Tris – HCl o stężeniu 0,05 molowym i pH 8,2 tak, aby aktywność trypsyny w uzyskanym roztworze wynosiła około 36-40 u. Tak pozyskany roztwór rozlewano na mniejsze porcje (około $2-3 \text{ cm}^3$ każda) i zamrażano w temperaturze -26°C . Podczas oznaczania aktywności roztwór trypsyny przechowywano w lodzie.

Aparat kalibrowano następującą mieszaniną:

- 0,35 cm³ buforu z albuminą (do 0,083 g albuminy wołowej dodano 50 cm³ buforu Tris-HCl),
- 0,05 cm³ CaCl₂ (0,2 M roztwór chlorku wapnia rozpuszczony w buforze Tris-HCl),
- 0,1 cm³ substratu (N- α -benzoilo-DL-arginylo-p-nitroanilid - BAPNA (do 0,0217 g BAPNA dodano 2,5 cm³ DMSO, a po rozpuszczeniu jeszcze 7,5 cm³ buforu Tris-HCl).

W celu oznaczenia inhibitora, badaną plazmę rozcieńczono 200x buforem Tris – HCl. Dalszy sposób przygotowania prób przedstawia tabela 4.1.

Tab.4.1. Przygotowywanie prób do oznaczenia

Odczynnik	Wzorzec (cm ³)	Inhibitor (cm ³)
Bufor z albuminą	0,3	0,25
CaCl ₂	0,05	0,05
Roztwór trypsyny wołowej	0,05	0,05
Plazma (odpowiednio rozcieńczona)	-	0,05

Po 5 minutowej inkubacji prób (temp.25°C) w spektrofotometrze, do każdej z kuwet dodano po 0,1 cm³ roztworu BAPNA, wymieszano ich zawartość i dokonano pomiaru przy długości fali 410 nm co 1 minutę przez 5 minut.

Zebrane wyniki aktywności podstawiono do wzoru:

(aktywność wzorcowa – aktywność inhibitorowa próby) x rozcieńczenie plazmy
i uzyskano wynik w u/l.

➤ Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym umożliwia rozdzielenie cząsteczek na zasadzie różnic w ruchliwości elektroforetycznej, przy jednoczesnym działaniu nośnika jako sita molekularnego.

Przygotowanie żeli

Rozdziały elektroforetyczne przeprowadzono na żelach poliakrylamidowych o różnej gęstości. Zgodnie z metodą opracowaną przez Laemmli'ego, wyróżniono żel zagęszczający i rozdzielający. W tabeli 4.2. zestawiono wszystkie odczynniki użyte do przeprowadzenia elektroforetycznych rozdzielaczy.

Tab.4.2. Wykaz odczynników użytych do elektroforezy

Nazwa	Stężenie i sposób przygotowania
Roztwór poliakrylamidu	60 g akrylamidu i 1,6 g bisakrylamidu rozpuścić w wodzie i uzupełnić do objętości 200 cm ³
Bufor do żelu zagęszczającego	O stężeniu 0,5 M i pH 6,8 (3,0 Tris rozpuścić w 40 cm ³ wody destylowanej, za pomocą kwasu solnego uzyskać pH 6,8, a następnie uzupełnić wodą do 50 cm ³)
Bufor do żelu rozdzielającego	O stężeniu 1,5 M i pH 8,8 (36,3 g Tris rozpuścić w 150 cm ³ wody destylowanej, za pomocą kwasu solnego uzyskać pH 8,8, a następnie uzupełnić wodą do 200 cm ³)
Bufor elektrodowy pH 8,3	0,025 M bufor Tris – HCl, 0,192 M roztwór glicyny, 0,1% roztwór SDS (należy odważyć: 3,028 g Tris, 14,413 g glicyny, 1 g SDS i rozpuścić w 1000 cm ³ wody)
Bufor do przygotowania prób pH 6,8	Do 2,5 cm ³ buforu zagęszczającego dodać 4 cm ³ 10% roztworu SDS, 2 cm ³ glicerolu, 2 mg bromophenol blue i 0,31 g DTT. Wymieszać i dopełnić wodą do 10 cm ³ . Przechowywać zamrożone w temp. –20°C.
Bufor obciążający pH 6,8	0,125 M Tris-HCl, 20% glicerol, 0,05% błękit bromofenolowy, pH 6,8
Odczynnik I (naważka na 1 żel)	5 mg N-Acetyl-DL_Phenylalanine B-Naphtyl esteru rozpuścić w 2 cm ³ N,N-Dimethyl-formamide (trucizna)
Odczynnik II (naważka na 1 żel)	10 mg o-Dianisidine,-Tetrazotized rozpuścić w 18 cm ³ 0,05 molowego buforu fosforanowego pH 7,4
Bufor fosforanowy pH 7,4	<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 M roztwór jednozasadowego fosforanu sodowego: 13,8 g NaH₂PO₄ x H₂O rozpuścić w 500 cm³ wody lub 15,605 g NaH₂PO₄ x 2H₂O rozpuścić w 500 cm³ wody • 0,2 M roztwór dwuzasadowego fosforanu sodowego: 17,805 g Na₂HPO₄ x 2H₂O rozpuścić w 500 cm³ wody lub 35,82 g Na₂HPO₄ x 12H₂O rozpuścić w 500 cm³ wody Zmieszać 19 cm ³ roztworu a) z 81 cm ³ roztworu b) i uzupełnić wodą do 200 cm ³ .
Roztwór barwiący	0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 rozpuścić w 50 % roztworze metanolu i 10 % roztworze kwasu octowego

Sposób otrzymania żelu zagęszczającego i rozdzielającego przedstawia tabela 4.3. (Laemmli 1970).

Tab.4.3. Składniki do sporządzania żeli

Składnik (odczynnik)	Żel zagęszczający	Żel rozdzielający
	Ilość odczynnika (cm ³)	
Roztwór poliakrylamidu	1,33	6,3
Bufor do żelu zagęszczającego o pH 6,8	2,5	-
Bufor do żelu rozdzielającego o pH 8,8	-	3,8
10 % roztwór SDS (dodecylo siarczan sodu)	0,1	0,15
Woda destylowana	6,0	4,8
10 % roztwór nadsiarczanu amonu	0,15	0,225
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina)	0,005	0,005

W niniejszej pracy przeprowadzono rozdziały elektroforetyczne z zastosowaniem aparatu do elektroforezy pionowej Mighty Small II firmy Amersham Pharmacia Biotech. (Szwecja) Rozdzielenia białek dokonano dwoma różnymi sposobami: za pomocą elektroforezy niedenaturującej, zwaną inaczej natywną i denaturującej (z dodatkiem dodecylo siarczanu sodu).

Elektroforeza natywna (bez dodatku SDS) pozwala rozdzielić białka ze względu na gęstość ich ładunku. Brak detergentu w postaci SDS-u powoduje utrzymanie białka w stanie niezdenaturowanym. Rozdziały elektroforetyczne przeprowadzono na 10% żelach poliakrylamidowych. Przed elektroforezą próby plazm nasienia mieszano z buforem obciążającym w stosunku 1:1. Na żel nanoszono po 21 μ l próby. Rozdziały przeprowadzono w buforze Tris-glicyna o pH 8,3 przy 20 mA i 200 V przez 85 minut. Po zakończeniu elektroforezy żele barwiono.

Barwienie żeli na aktywność inhibitora trypsyny

Żel inkubowano w roztworze trypsyny wołowej (1,5 mg trypsyny wołowej w 25 cm³ 0,1 molowego buforu fosforanowego pH 7,4 / 1 żel) przez 15 minut w temperaturze 37°C. Następnie zlano roztwór trypsyny, zalano żel mieszaniną barwiącą tzn. mieszaniną odczynników I i II (odczynniki te połączono przed samym użyciem) i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej w kołysce przez 45 – 60 minut. Po upływie tego czasu zlano mieszaninę i zalano żel 2 % roztworem kwasu octowego (Uriel i Berges 1968).

Z kolei elektroforeza denaturująca (SDS-PAGE) pozwala oznaczyć masy molekularne rozdzielonych białek. Rozdziały przeprowadzono na 12,5 % żelach poliakryloamidowych z dodatkiem SDS, dzięki któremu białka w plazmie nasienia zostają rozbite na podjednostki – łańcuchy polipeptydowe. Białka o niższych masach cząsteczkowych będą migrować szybciej, aniżeli te o wyższej masie. Przed elektroforezą, próby plazm nasienia rozcieńczono roztworem soli fizjologicznej w stosunku 1:3, a następnie uzyskany roztwór zmieszano z buforem do przygotowania prób z dodatkiem SDS i DTT (ditiotreitól) w stosunku 1:1. Z przygotowanej mieszaniny pobrano 0,005 cm³ i naniesiono do odpowiednich studzienek w żelu. Równolegle naniesiono mieszaninę standardów firmy Bio-Rad. W przypadku rozdzielania białek plazmy nasienia użyto mieszaninę wzorców o masie cząsteczkowej od 7,2 kDa do 206,0 kDa. Natomiast rozdzielając białka o aktywności proteolitycznej, użyto wzorców o następującym zakresie: od 21,4 kDa do 110 kDa. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przy stałym natężeniu 40 mA i napięciu o wartości 200 V. Po zakończeniu elektroforezy (około 90 minut) żele barwiono.

Barwienie żeli metodą Coomassie (na białko)

Żele umieszczono w 100 cm³ roztworu barwiącego, na 18 h w temperaturze pokojowej. Następnie nadmiar barwnika wypłukano z żelu rozpuszczalnikiem o składzie woda : metanol : kwas octowy w proporcji 8:2:1, do uzyskania bezbarwnego tła. Z tak przygotowanego elektroforogramu, na podstawie mas molekularnych wzorców (7,2÷206,0 kDa), wyznaczono masy cząsteczkowe rozdzielonych frakcji białkowych, a w przeprowadzonej analizie densytometrycznej oznaczono relatywną gęstość optyczną (RGO) prążków białkowych. Podobną ocenę uzyskanego elektroforogramu wykonano w przypadku użycia mieszaniny wzorców o zakresie mas molekularnych od 21,4 kDa do 110,0 kDa.

Masy molekularne frakcji białkowych były oceniane przy użyciu programu Kodak 1D (Eastman Kodak company, New Haven, USA).

4.5. Ocena zdolności reprodukcyjnej samców

Oceny zdolności reprodukcyjnej badanych samców dokonano na podstawie ustalenia płodności (skuteczności pokrycia) i plenności. W tym celu zliczono samice pokryte, samice wyszczenione i urodzone szczenięta.

4.6. Analiza statystyczna

Zebrane dane nie spełniają założeń o normalności rozkładu i jednorodności wariancji wymaganych przy stosowaniu parametrycznych testów statystycznych. Test Shapiro-Wilka i analiza normalnych wykresów prawdopodobieństwa wykazują brak rozkładu normalnego dla większości zmiennych. W celu uzyskania rozkładu normalnego przeprowadzono transformację danych. Pomimo przekształceń matematycznych (logarytmowanie, pierwiastkowanie) nie osiągnięto rozkładu normalnego i jednorodności wariancji.

Szacowanie statystycznej istotności oddziaływania terminu pobrania nasienia na wartości poszczególnych parametrów, wykonano z wykorzystaniem nieparametrycznej jednoczynnikowej analizy wariancji (test Kruskala-Wallisa). Ocenę współzależności między zmiennymi przeprowadzono w oparciu o współczynnik korelacji Spearmana.

Obliczenia statystyczne uzyskanych wyników wykonano przy pomocy programu Statistica 5.0 oraz Microsoft Excel 2003.

5. WYNIKI BADAŃ

5.1. Charakterystyka podstawowych parametrów jakościowych ejakulatów lisa polarnego *Alopex lagopus* w sezonie rozrodczym

Ocenie statystycznej poddano wartości parametrów jakościowych ejakulatów pozyskanych od lisów polarnych w 2003 roku. Dla scharakteryzowania zmienności badanych cech lisa polarnego w sezonie rozrodczym podano miary statystyczne tj. wartość średnią, minimalną i maksymalną oraz medianę danej cechy. Uzyskane wartości parametrów charakteryzowały się brakiem rozkładu normalnego, dlatego zastosowano testy nieparametryczne.

Z uzyskanych danych wynika, iż objętość ejakulatów charakteryzowała się dużą zmiennością we wszystkich analizowanych pobraniach. Potwierdzają to wartości minimalne i maksymalne (tab. 5.1). Najniższą średnią objętość nasienia ($0,27 \text{ cm}^3$) w badanym okresie, zanotowano w pierwszym terminie pobrania. Z kolei najwyższe średnie wartości objętości nasienia ($0,53$ i $0,57 \text{ cm}^3$) uzyskano odpowiednio w pobraniu trzecim i siódmym. Natomiast średnia objętość wszystkich ejakulatów zebranych w sezonie rozrodczym wynosiła $0,39 \text{ cm}^3$.

Wyniki testu Kruskala–Wallisa pozwoliły na potwierdzenie statystycznie istotnych różnic między średnimi wartościami ejakulatów lisa polarnego w zależności od terminu pobrania.

Tab. 5.1. Wartości objętości ejakulatów lisa polarnego w sezonie rozrodczym [cm^3]

Miary statyst.	Termin pobrania							
	ogółem n=126	1 n=18	2 n=18	3 n=18	4 n=18	5 n=18	6 n=18	7 n=18
\bar{x}	0,39	0,27	0,32	0,53	0,42	0,28	0,31	0,57
mediana	0,35	0,28	0,25	0,45	0,33	0,30	0,28	0,45
min	0,05	0,08	0,05	0,15	0,18	0,18	0,11	0,26
max.	1,50	0,55	0,95	1,50	0,95	0,38	0,68	1,00

Podczas każdego z siedmiu pobrań w trakcie trwania sezonu rozrodczego stwierdzono dużą rozpiętość wartości koncentracji plemników (tab. 5.2.). Przy średniej wartości tej cechy wynoszącej $491,77 \times 10^6/\text{cm}^3$, najwyższą koncentracją charakteryzowały się ejakulatory uzyskane podczas drugiego pobrania – $799,72 \times 10^6/\text{cm}^3$. Z kolei najniższe wartości koncentracji plemników uzyskano w pobraniu piątym i siódmym, odpowiednio $273,54 \times 10^6/\text{cm}^3$ i $275,42 \times 10^6/\text{cm}^3$. Na uwagę zasługuje fakt, że w ejakulatach pozyskanych z piątego i siódmego pobrania wartości koncentracji plemników charakteryzowały się najmniejszą zmiennością.

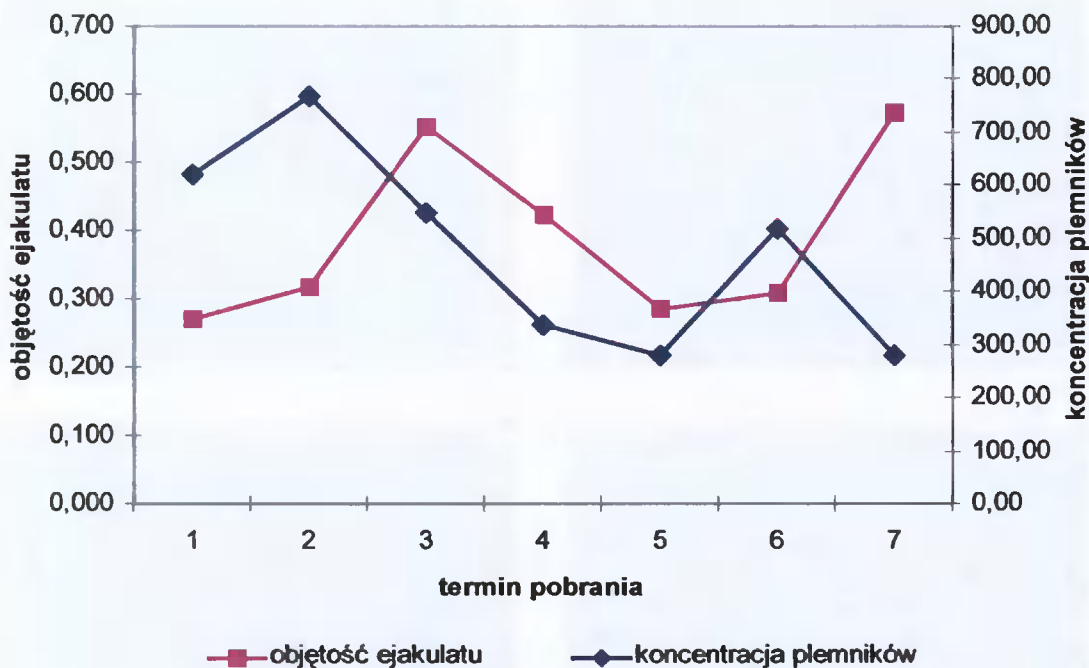
Obliczone średnie wartości koncentracji plemników różniły się statystycznie istotnie przy $p \leq 0,001$ w zależności od terminu pobrania.

Tab. 5.2. Wartości koncentracji plemników w ejakulatach lisa polarnego w sezonie rozrodczym [$\times 10^6/\text{cm}^3$]

Miary statyst.	Termin pobrania							
	ogółem n=126	1 n=18	2 n=18	3 n=18	4 n=18	5 n=18	6 n=18	7 n=18
\bar{x}_{sr}	491,77	674,85	799,72	554,24	73,68	73,54	490,94	275,42
mediana	341,25	636,88	871,88	508,13	307,50	213,13	403,13	243,75
min	40,00	103,75	255,00	118,75	40,00	40,00	46,25	141,25
max.	1678,75	1576,25	1678,75	1597,5	907,50	693,75	1466,25	706,25

Zestawiając razem, powyższe wyznaczniki jakościowe nasienia łatwiej było ocenić pobrane ejakulatory w zależności od terminu pobrania. Z przedstawionych zależności wynika, że na początku sezonu rozrodczego, na który przypadało pierwsze i drugie pobranie, uzyskiwano ejakulatory o najmniejszej objętości, ale i o najwyższej koncentracji plemników. W trzecim, czwartym i piątym pobraniu ejakulatory charakteryzowały się większą objętością, ale niższą koncentracją plemników. Z kolei w ejakulatach uzyskanych w pobraniu szóstym ponownie można było zaobserwować wzrost koncentracji plemników i zmniejszenie objętości ejakulatów. Pobranie siódme, przypadające na koniec sezonu rozrodczego, charakteryzowały ejakulatory o stosunkowo niskiej koncentracji plemników, ale i o największej objętości.

Na ryc. 5.1. przedstawiono dynamikę zmian dwóch wyznaczników jakości nasienia: objętości ejakulatu i koncentracji plemników przez cały czas trwania sezonu rozrodczego.



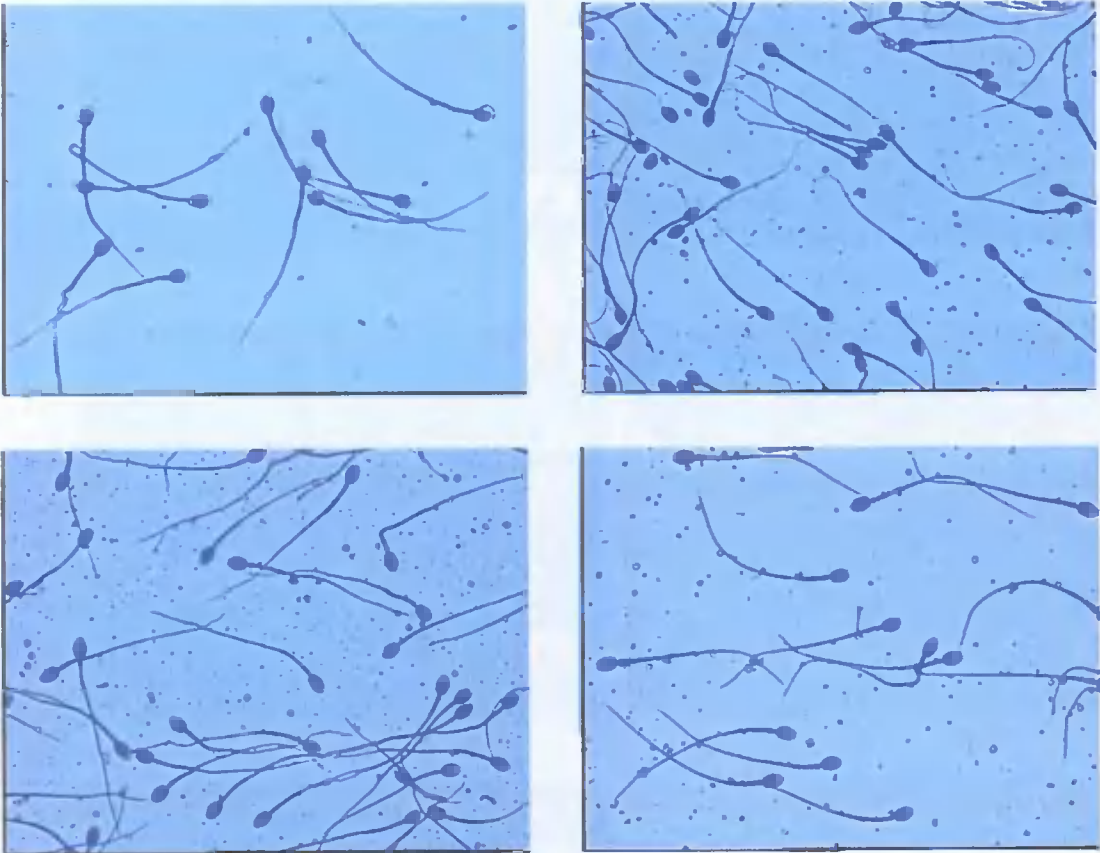
Ryc. 5.1. Średnia objętość ejakulatu (cm³) i koncentracja plemników (x 10⁶/cm³) w nasieniu lisa polarnego w sezonie rozrodczym.

Istotną analizowaną cechą, charakteryzującą się małą zmiennością w obrębie poszczególnych pobrań, było pH ejakulatów (tab. 5.3.). Wartość średnia dla wszystkich pozyskanych prób nasienia kształtowała się na poziomie 6,12. Najniższą wartością pH – 6,02 charakteryzowały się ejakulatory uzyskane od lisów podczas siódmego pobrania, a najwyższą – 6,23 podczas pobrania drugiego.

Tab.5.3. Wartości pH ejakulatów lisa polarnego w sezonie rozrodczym

Miary statyst.	Termin pobrania							
	ogółem n=126	1 n=18	2 n=18	3 n=18	4 n=18	5 n=18	6 n=18	7 n=18
\bar{x}_{sr}	6,12	6,23	6,14	6,13	6,13	6,03	6,17	6,02
mediana	6,00	6,25	6,00	6,00	6,00	6,00	6,15	6,00
min	5,90	6,00	6,00	5,90	6,00	6,00	6,00	6,00
max.	6,80	6,60	6,40	6,80	6,30	6,30	6,30	6,30

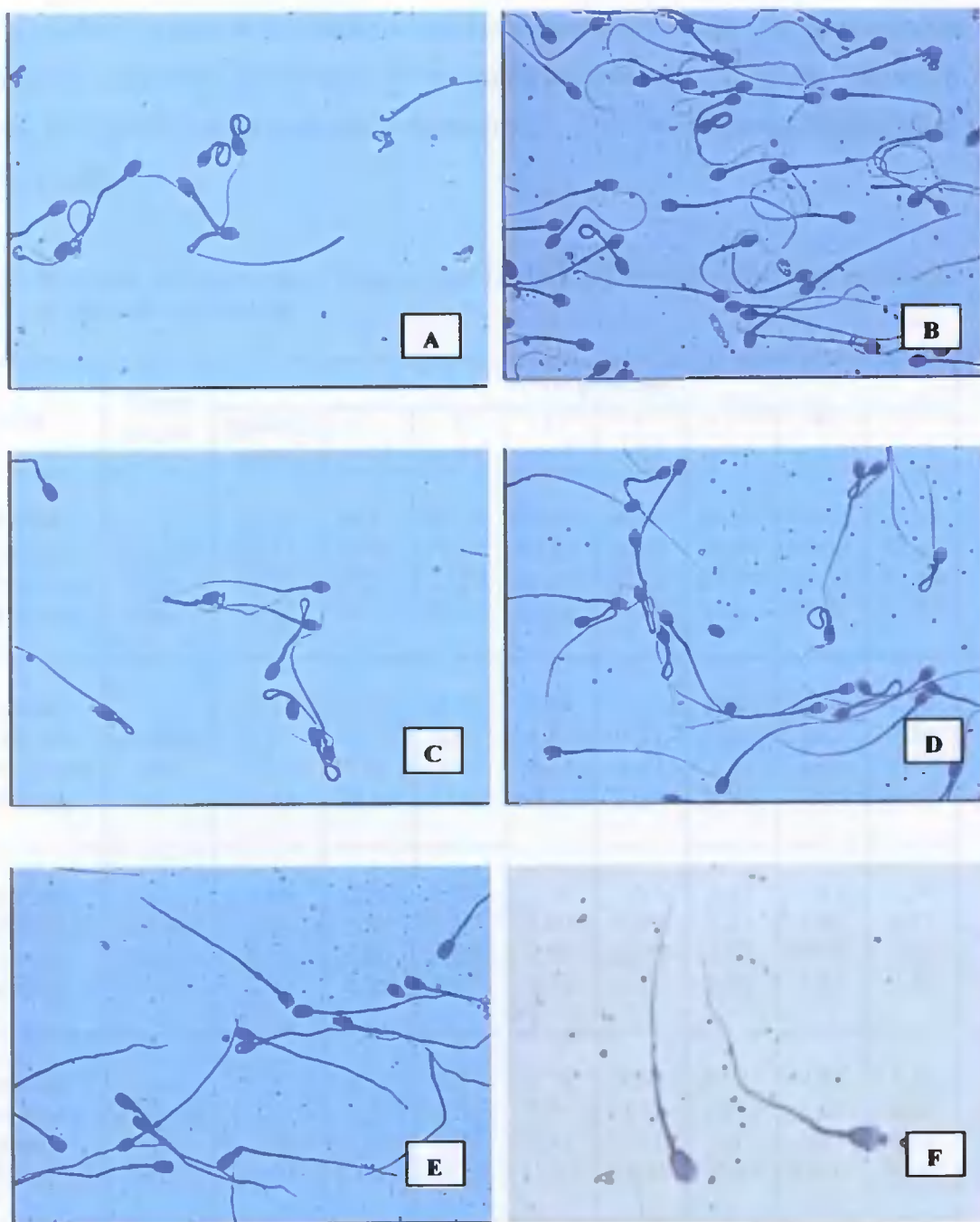
Wyniki analizy morfologicznej wykazały, że średnio 89,88 % plemników odznaczało się prawidłową budową (fot. 5.1.).



Fot. 5.1. Plemniki o prawidłowej budowie

Pozostała część plemników (10,12%) charakteryzowała się pewnymi anomaliaми. Wśród plemników z nieprawidłową budową najczęściej było z wadami podrzędnymi – 8,27 %, a tylko 1,84 % stanowiły plemniki z wadami głównymi (fot. 5.2 i tab. 5.4.).

Najczęściej występującymi wadami głównymi były wady witki tzw. wady Daga i wady wstawki. Spośród wad podrzędnych najczęściej było: z pojedynczą pętlą witki, z pętlą lub zagięciem na końcu witki oraz plemników z luźnymi ale prawidłowymi główkami. W żadnym z analizowanych preparatów nie stwierdzono nieprawidłowego kształtu główki.



Fot. 5.2. Plemniki o nieprawidłowej budowie: A, B - zwinięta w pętle lub ślimaki witka (efekt Daga); C, D - z pojedynczą pętlą; E - kroplą protoplazmy położeniu dalszym; F- uszkodzony akrosom

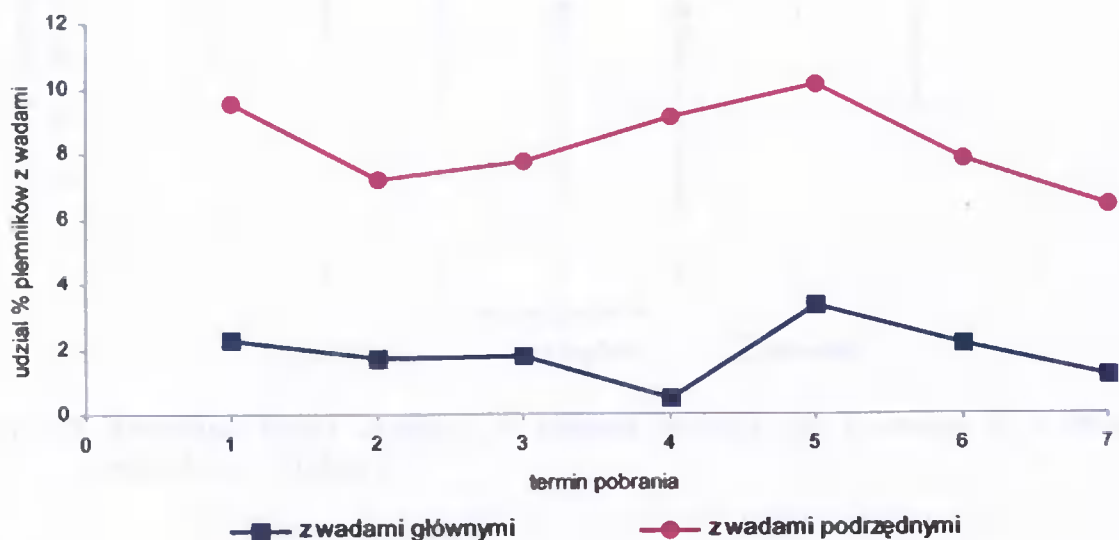
Ejakulatory uzyskane w siódmym pobraniu charakteryzowały się największym procentowym udziałem plemników o prawidłowej budowie – 92,42, natomiast najniższy procentowy udział plemników normalnych – 86,59 występował w ejakulatach z pobrania piątego.

Tab.5.4. Wartości podstawowych parametrów jakościowych ejakulatów lisa polarnego w sezonie rozrodczym

Cecha	Miary statyst	Termin pobrania							
		ogółem n=126	1 n=18	2 n=18	3 n=18	4 n=18	5 n=18	6 n=18	7 n=18
% udział plemników morfologicznie normalnych	\bar{x}	89,88	88,21	91,09	90,48	90,37	86,59	90,02	92,42
	mediana	90,34	89,67	92,00	92,67	90,17	86,34	90,34	92,67
	min	81,00	80,34	82,33	81,00	80,67	81,00	81,33	89,33
	max.	96,67	94,33	96,67	95,33	95,33	94,66	95,33	95,33
% udział plemników z nieprawidłową morfologią	\bar{x}	10,12	11,79	8,91	9,54	9,61	13,41	9,98	7,58
	mediana	9,67	10,33	8,01	7,34	9,84	13,67	9,67	7,34
	min	3,33	5,00	3,33	4,00	4,67	5,34	5,67	5,67
	max.	20,66	19,66	17,67	18,33	20,66	20,66	18,67	10,67
% udział plemników z wadami głównymi	\bar{x}	1,84	2,26	1,70	1,76	0,52	3,33	2,15	1,18
	mediana	2,00	2,33	1,67	2,00	0,00	3,33	2,00	0,67
	min	0,00	1,00	0,33	0,00	0,00	1,67	0,00	0,00
	max.	5,00	4,33	2,67	3,33	2,33	5,00	3,67	2,67
% udział plemników z wadami podrzędnymi	\bar{x}	8,27	9,54	7,20	7,78	9,09	10,07	7,83	6,39
	mediana	7,66	8,34	6,17	5,34	9,17	10,34	7,00	6,17
	min	2,33	2,67	2,33	2,33	3,33	3,67	4,33	3,34
	max.	19,33	18,33	15,67	15,67	19,33	16,67	18,67	10,67

Na ryc. 5.2. przedstawiono procentowy udział zmienionych morfologicznie plemników (rozdzielając wady główne i podrzędne) w zależności od terminu pobrania ejakulatów. Zarówno jedna jak i druga krzywa obrazuje podobną tendencję tzn. niewielki spadek (między pierwszym a drugim pobraniem), stopniowy wzrost (aż do pobrania numer pięć) i powolny spadek (ostanie – siódme pobranie).

Wyjątek stanowi tylko czwarty termin pobrania, w którym to pozyskane ejakulatory charakteryzowały się najmniejszym procentowym udziałem plemników z wadami głównymi (0,52) i stosunkowo dużym procentowym udziałem plemników z wadami podrzędnymi (9,09).

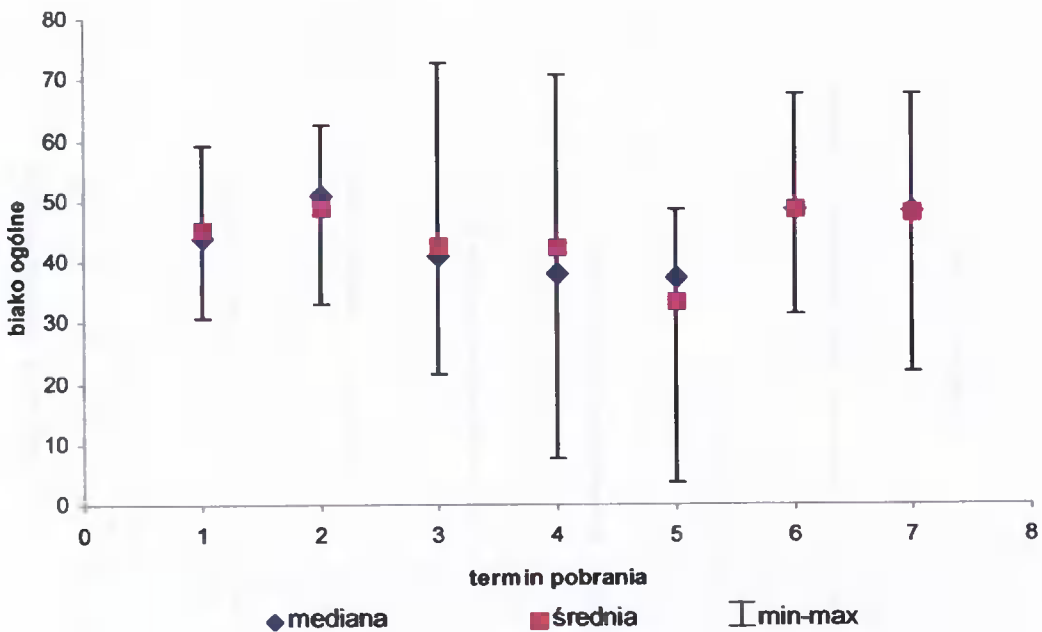


Ryc. 5.2. Zmiany morfologiczne plemników w okresie całego sezonu rozrodczego

Zawartość białka ogólnego oraz aktywności badanych enzymów w plazmie nasienia lisa polarnego w okresie sezonu rozrodczego przedstawiono w tabeli 5.5. zamieszczonej w załączniku.

Analizując wszystkie ejakulatory obliczono średnią zawartość białka całkowitego. Wartość ta wynosiła $44,14 \text{ mg/cm}^3$. Z przedstawionych danych wynika, że średnia zawartość białka ogólnego w plazmie nasienia miała porównywalną wartość (około 45 mg/cm^3) we wszystkich badanych pobraniach (ryc. 5.3.).

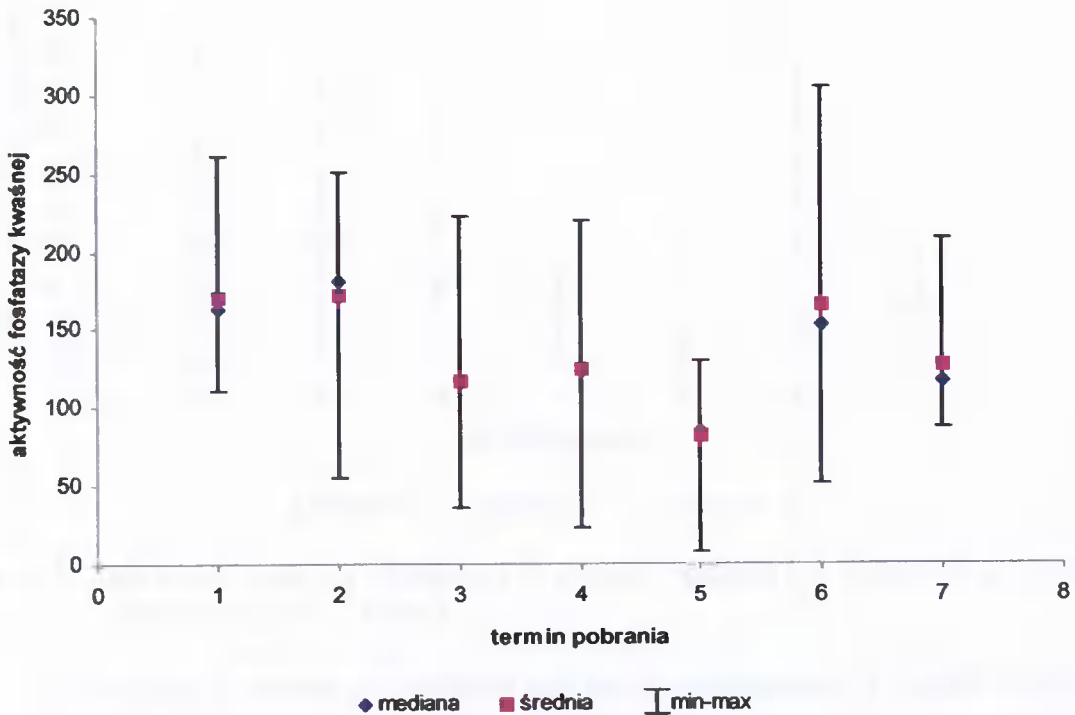
Wyjątek stanowiło pobranie piąte gdzie średnia wartość białka ogólnego była niższa i kształtowała się na poziomie $33,23 \text{ mg/cm}^3$. Zastosowany test Kruskala-Wallisa pozwolił stwierdzić, że obliczone wartości białka ogólnego w plazmie nasienia różniły się statystycznie istotnie w zależności od terminu pobrania (przy $p \leq 0,05$).



Ryc.5.3. Zawartość białka ogólnego w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym [mg/cm^3]

Kolejną analizowaną cechą ejakulatów była aktywność fosfatazy kwaśnej (ryc. 5.4). W całym sezonie rozrodczym średnia aktywność fosfatazy kwaśnej kształtowała się na poziomie $136,66 \text{ U}/\text{dm}^3$. Najwyższą aktywnością charakteryzowała się plazma nasienia pochodząca z ejakulatów uzyskanych w drugim pobraniu, a najniższą w piątym pobraniu (odpowiednio $173,04$ i $82,11 \text{ U}/\text{dm}^3$).

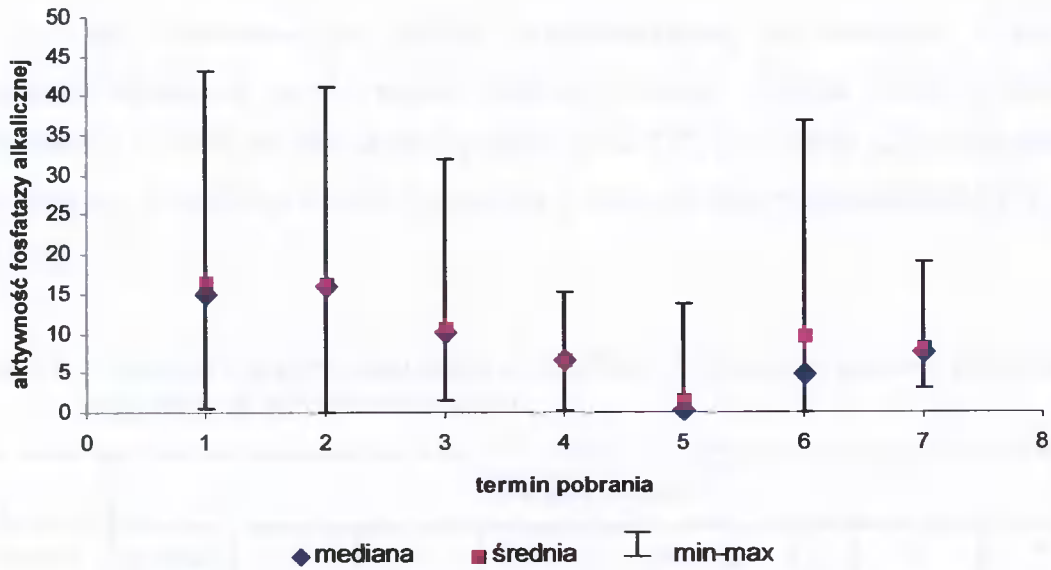
Oznaczone aktywności fosfatazy kwaśnej różniły się statystycznie istotnie (przy $p \leq 0,001$) w zależności od terminu pobrania, co potwierdził przeprowadzony test nieparametryczny.



Ryc. 5.4. Aktywność fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym [U/dm³]

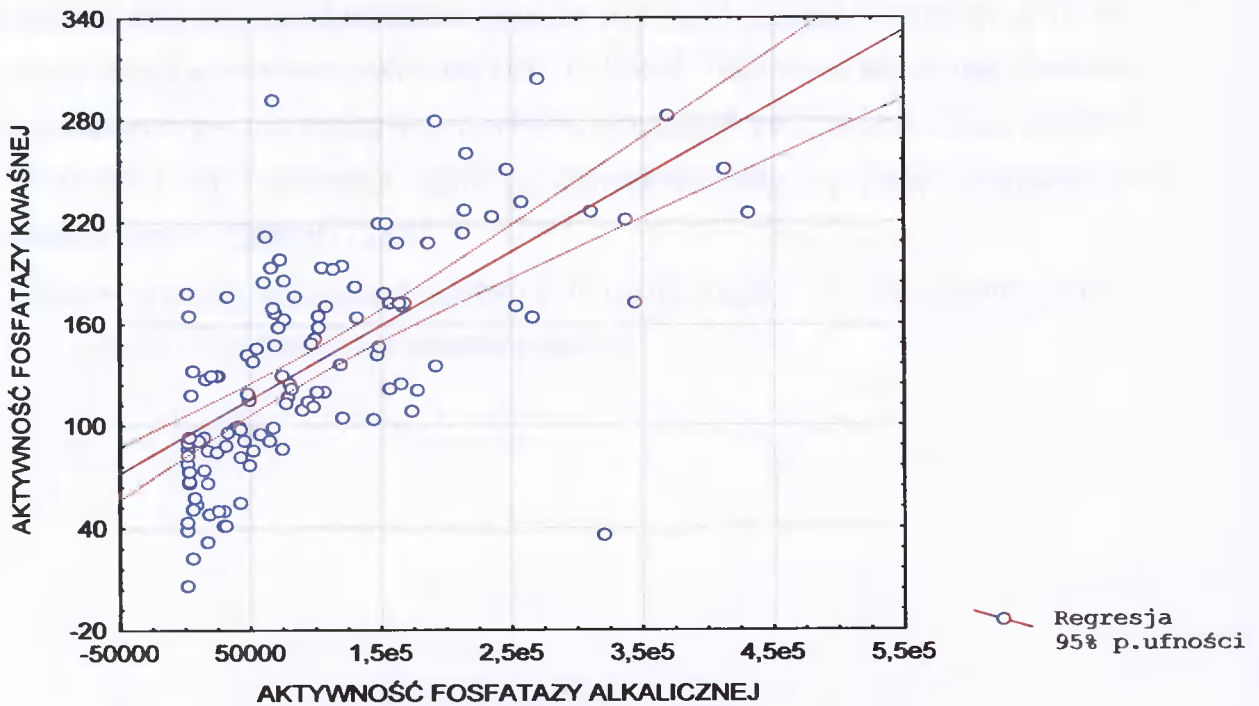
Średnia aktywność fosfatazy alkalicznej w całym sezonie rozrodczym była bardzo wysoka i wynosiła 102136,91 U/dm³. Plazma nasienia z ejakulatów pozyskanych w pierwszym i drugim pobraniu charakteryzowała się najwyższymi aktywnościami tego enzymu (odpowiednio 166012,2 i 163270,2 U/dm³). Z kolei najniższą średnią aktywność fosfatazy alkalicznej stwierdzono w piątym pobraniu – 8411,0 U/dm³ (ryc. 5.5).

Na podstawie zastosowanego do oszacowania istotności różnic testu statystycznego, stwierdzono różnice między określonymi w plazmie nasienia wartościami fosfatazy alkalicznej w zależności od terminu pobrania prób nasienia (przy $p \leq 0,001$).



Ryc.5.5. Aktywność fosfatazy alkalicznej w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym [$\times 10^4$ U/dm³]

Analizując poszczególne pobrania pod kątem oznaczonych w plazmie nasienia aktywności enzymów (fosfatazy kwaśnej i alkalicznej) można zauważyć pewną tendencję zmian. Potwierdza to wysoko statystycznie istotny współczynnik korelacji Spearmana, wynoszący $r_{xy} = 0,7043$.



Ryc. 5.6. Zależność między aktywnością fosfatazy kwaśnej a aktywnością fosfatazy alkalicznej

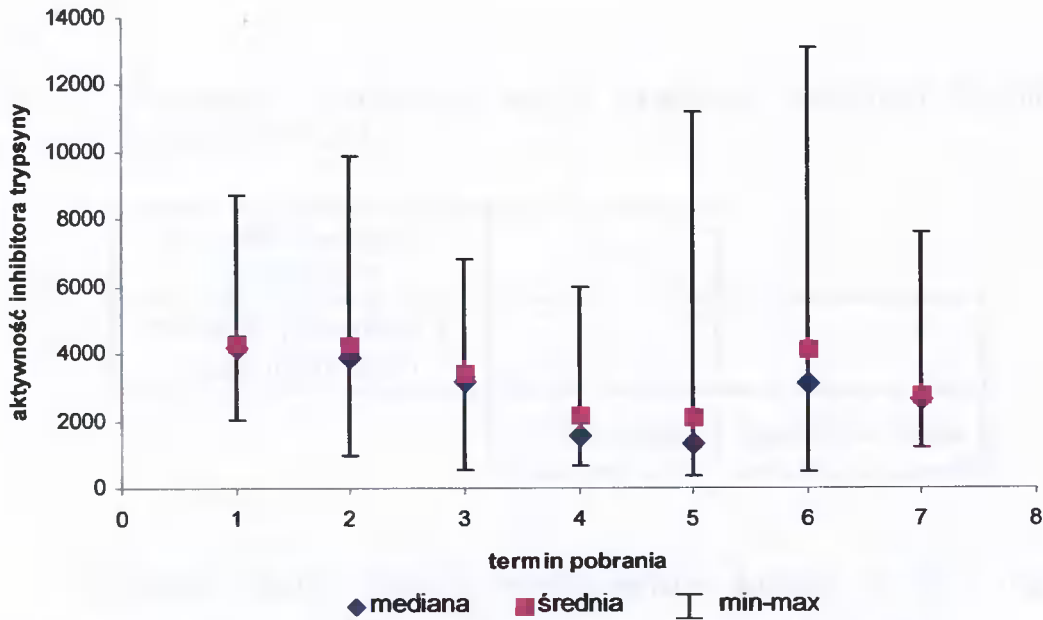
Dużą różnorodnością wyników charakteryzował się stosunek aktywności fosfatazy alkalicznej do aktywności fosfatazy kwaśnej. Średnia wielkość stosunku aktywności fosfataz za cały okres wyniosła około 742, przy czym najwyższą wartość osiągnął on w trzecim pobraniu, a najniższą w pobraniu piątym (odpowiednio 1241,22 i 161,90).

Tab.5.6. Stosunek fosfatazy alkalicznej do fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym

Miary statyst	Termin pobrania							
	ogółem n=126	1 n=18	2 n=18	3 n=18	4 n=18	5 n=18	6 n=18	7 n=18
\bar{x}	742,51	950,71	995,85	1241,22	454,95	161,90	557,97	562,87
mediana	578,84	934,41	959,91	709,64	451,51	29,07	409,73	578,84
min	3,68	38,69	6,67	40,90	31,87	5,51	3,68	86,00
max.	8796,35	1922,09	2947,19	8796,35	823,92	1453,78	2696,70	1403,61

Kolejnym analizowanym wyznacznikiem, charakteryzującym ejakulatory lisa polarnego była aktywność inhibitora trypsyny (ryc. 5.7.). Średnia wartość tej cechy dla całego sezonu rozrodczego wynosiła 3305,71 U/dm³. Najwyższą aktywność inhibitora stwierdzono w plazmie nasienia z ejakulatów uzyskanych podczas pierwszego pobrania – 4296,48 U/dm³, natomiast najniższą charakteryzowały się próby pozyskane w pobraniu piątym – 2089,83 U/dm³.

Uzyskane wartości aktywności inhibitora trypsyny różniły się statystycznie istotnie (przy $p \leq 0,001$) w zależności od terminu pobrania.



Ryc.5.7. Aktywność inhibitora trypsyny w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym [U/dm³]

5.2. Korelacje między wybranymi parametrami jakości nasienia lisa polarnego *Alopex lagopus*

W celu potwierdzenia występowania współzależności między parametrami biochemicznymi, a cechami jakościowymi ejakulatów lisa polarnego w sezonie rozrodczym obliczono współczynniki korelacji Spearmana. Wykresy przedstawiające zależności o najwyższych współczynnikach korelacji umieszczono w załączniku (rys. 5.8.-5.13).

Analiza danych wskazała na występowanie ujemnej i statystycznie istotnej ($p \leq 0,05$) korelacji między aktywnością fosfatazy kwaśnej a procentowym udziałem plemników z wadami głównymi budowy morfologicznej ($r_{xy} = -0,2078$). Podobną ujemną współzależność stwierdzono między zawartością białka ogólnego a procentowym udziałem plemników z wadami głównymi budowy morfologicznej ($r_{xy} = -0,2091$). Natomiast współczynnik korelacji między zawartością białka ogólnego a odsetkiem plemników o prawidłowej budowie morfologicznej był dodatni i wynosił ($r_{xy} = 0,1982$, $p \leq 0,05$).

Tab. 5.7. Współczynniki korelacji (r) między wybranymi parametrami nasienia lisa polarnego (n= 126)

% udział plemników normalnych	0,1982*	
% udział plemników z wadami głównymi	-0,2091*	-0,2078*
	białko ogólne	fosfataza kwaśna

* $p \leq 0,05$

Najwyższe dodatnie wartości współczynników korelacji ($p \leq 0,01$) uzyskano między aktywnością inhibitora trypsyny a koncentracją plemników, między aktywnością inhibitora a aktywnością fosfatazy alkalicznej oraz między aktywnością inhibitora a aktywnością fosfatazy kwaśnej (odpowiednio $r_{xy} = 0,6516$, $r_{xy} = 0,8100$ i $r_{xy} = 0,6507$).

Jak wynika z tabeli 5.7. wykazano szereg statystycznie istotnych ($p \leq 0,01$) zależności między zawartością białka ogólnego a aktywnością inhibitora trypsyny i koncentracją plemników (odpowiednio $r_{xy} = 0,3577$ i $r_{xy} = 0,2761$). Ponadto zawartość białka ogólnego była dodatnio skorelowana z aktywnością fosfatazy alkalicznej i aktywnością fosfatazy kwaśnej (odpowiednio $r_{xy} = 0,4158$ i $r_{xy} = 0,578$).

Tab. 5.7. Współczynniki korelacji (r) między wybranymi parametrami nasienia lisa polarnego (n= 126)

białko ogólne	0,3577**	
koncentracja plemników	0,6516**	0,2761**
fosfataza alkaliczna	0,8100**	0,4158**
fosfataza kwaśna	0,6507**	0,578**
	inhibitor	białko ogólne

** $p \leq 0,01$

Analiza wyników badań wykazała występowanie dodatnich i statystycznie istotnych ($p \leq 0,01$) korelacji między aktywnością fosfatazy alkalicznej i koncentracją plemników ($r_{xy} = 0,6302$). Podobną współzależność stwierdzono między aktywnością tego enzymu i aktywnością fosfatazy kwaśnej ($r_{xy} = 0,7043$). Natomiast aktywność fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia była dodatnio skorelowana z koncentracją plemników ($r_{xy} = 0,5676$).

Ujemne współzależności ($p \leq 0,01$) zanotowano również między objętością ejakulatu a aktywnością inhibitora trypsyny i koncentracją plemników (odpowiednio $r_{xy} = -0,3542$ i $r_{xy} = -0,4356$). Podobna zależność uzyskano między objętością ejakulatu a aktywnością fosfatazy alkalicznej i aktywnością fosfatazy kwaśnej (odpowiednio $r_{xy} = -0,2783$ i $r_{xy} = -0,3456$).

Tab. 5.8. Współczynniki korelacji (r) między wybranymi parametrami nasienia lisa polarnego ($n = 126$)

fosfataza alkaliczna	0,6302**				
fosfataza kwaśna	0,5676**	0,7043**			
objętość	-0,4356**	-0,2783**	-0,3456**	-0,3542**	-0,0963
	koncentracja plemników	fosfataza alkaliczna	fosfataza kwaśna	inhibitor	białko ogólne

** $p \leq 0,01$

Aktywność fosfatazy alkalicznej skorelowano z odsetkiem plemników z wadami głównymi. Zależność tę opisuje ujemny współczynnik korelacji kształtujący się na poziomie $-0,2528$ ($p \leq 0,01$).

Wykazano także istotne korelacje: dodatnią - między objętością ejakulatu a % udziałem plemników o prawidłowej budowie morfologicznej ($r_{xy} = 0,2548$) i ujemną - między objętością ejakulatu a odsetkiem plemników z wadami podrzędnymi wykrytymi podczas analizy morfologicznej ($r_{xy} = -0,2474$).

Dodatkowo wykazano istotne statystycznie ($p \leq 0,01$), aczkolwiek ujemne zależności między % udziałem plemników o budowie prawidłowej z odsetkiem plemników z wadami głównymi i z wadami podrzędnymi w budowie morfologicznej (odpowiednio $r_{xy} = -0,3297$ i $r_{xy} = -0,9455$).

Tab. 5.9. Współczynniki korelacji (r) między wybranymi parametrami nasienia lisa polarnego (n= 126)

% udział plemników normalnych	0,2548**		
% udział plemników z wadami głównymi	-0,0701	-0,3297**	
% udział plemników z wadami podrzędnymi	-0,2474**	-0,9455**	0,0510
	objętość	% udział plemników normalnych	% udział plemników z wadami głównymi

** $p \leq 0,01$

W pozostałym przypadkach nie wykazano żadnych współzależności między analizowanymi cechami.

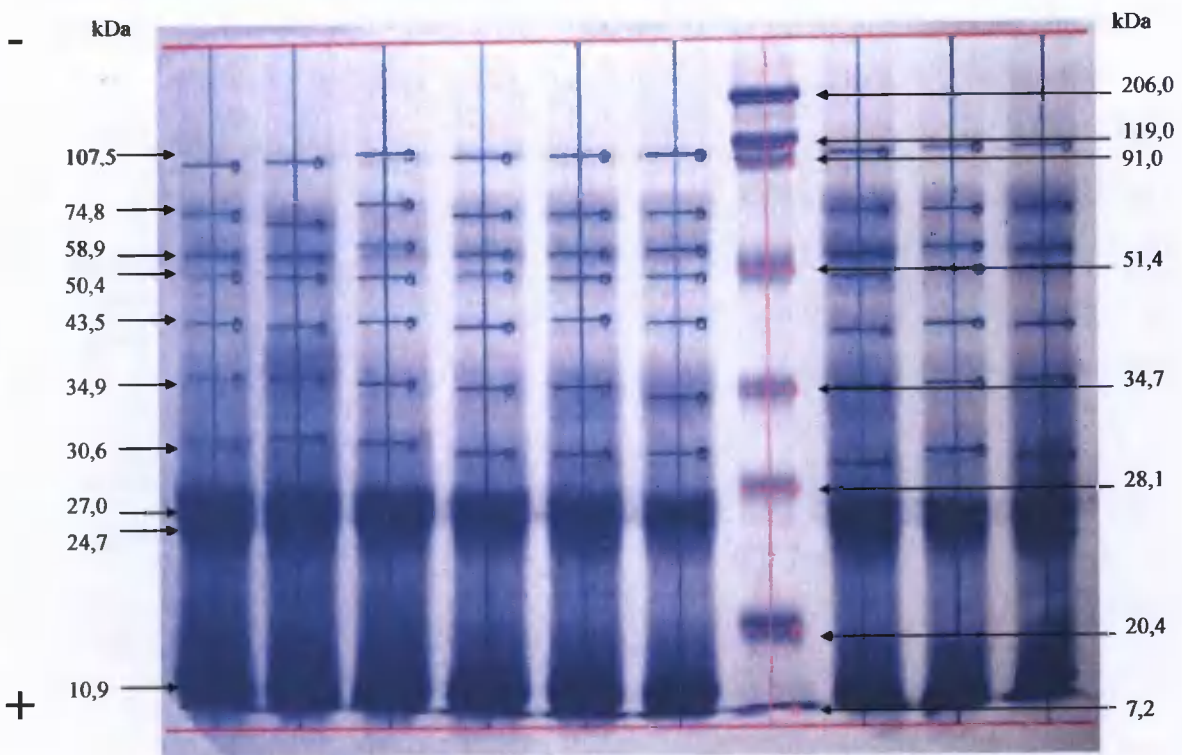
Tab. 5.10. Współczynniki korelacji (r) między wybranymi parametrami nasienia lisa polarnego (n= 126)

% udział plemników normalnych	-0,1142	0,1982*	-0,0331	0,0213	-0,0451
% udział plemników z wadami głównymi	-0,0975	-0,2091*	-0,1557	-0,2528**	-0,2078*
% udział plemników z wadami podrzędnymi	0,1644	-0,1680	0,0893	0,0494	0,0915
	inhibitor	białko ogólne	koncentracja plemników	fosfataza alkaliczna	fosfataza kwaśna

** $p \leq 0,01$ * $p \leq 0,05$

5.3. Profile elektroforetyczne białek plazmy nasienia

W celu rozdzielenia i wyznaczenia mas cząsteczkowych frakcji białkowych wykonano elektroforezę denaturującą (SDS-PAGE). Analizie poddano plazmy nasienia pochodzące od dziewięciu losowo wybranych osobników z pobrania pierwszego. Analogicznym badaniom, poddano uzyskaną od tych samych samców plazmę z pobrania siódmego. Dodatkowo przeprowadzono rozdzielanie elektroforetyczne białek plazmy nasienia pobranego od trzech losowo wybranych osobników przez wszystkie siedem pobrań.

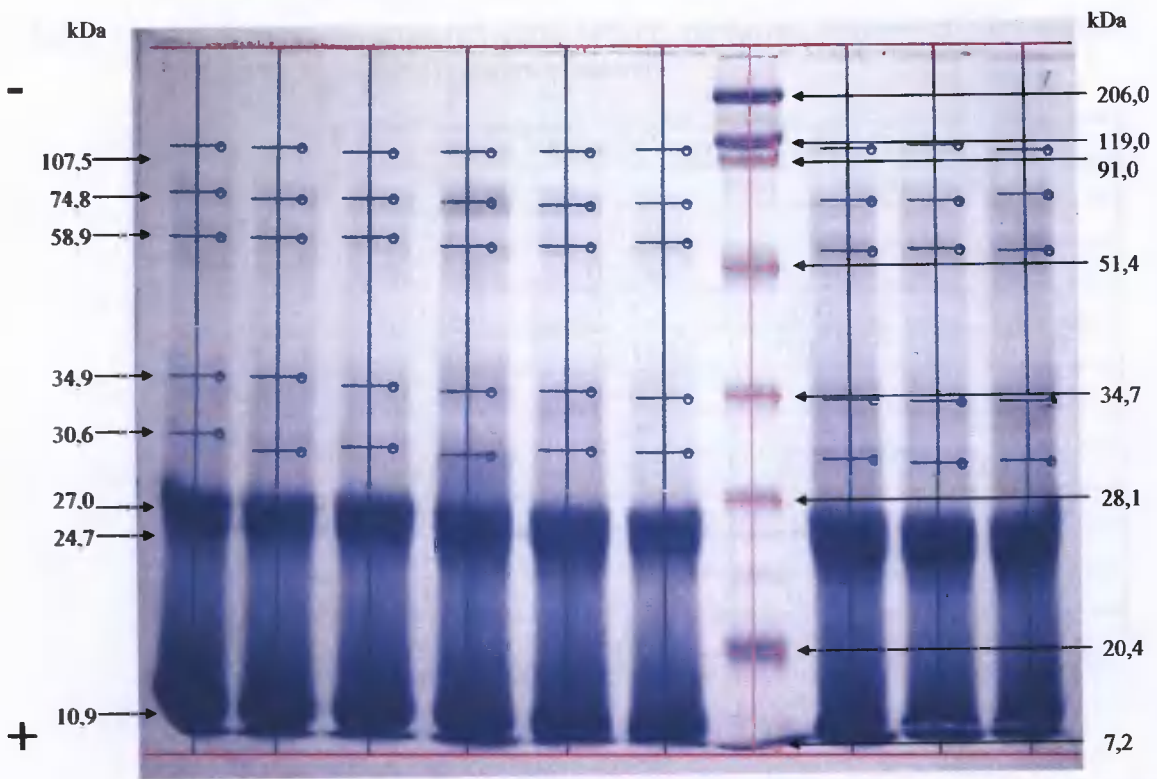


Fot. 5.3. Obraz elektroforetyczny białek plazmy nasienia uzyskany w wyniku elektroforezy denaturującej (plazmy pochodzące z pobrania pierwszego)

Fotografia 5.3. przedstawia rozdział elektroforetyczny białek plazmy nasienia uzyskanej w pobraniu I. Analizowane plazmy pochodziły od dziewięciu, losowo wybranych osobników. We wszystkich przypadkach stwierdzono obecność dziesięciu, różnych frakcji białkowych. Frakcja o największej masie cząsteczkowej, wynoszącej około 107,5 kDa, stanowiła pasmo o słabej intensywności. W podobnej ilości pojawiły się białka o masie 50,4 i 43,5 kDa.

Okolo 4÷5 - krotnie większą od nich, wartością relatywną intensywności (gęstości optycznej) charakteryzowały się białka o masie 78,4; 58,9; 34,9 i 30,6 kDa. Następne wyróżnione prążki białkowe (o masie cząsteczkowej 27 i 24,7 kDa), w porównaniu z frakcją o masie 50,4 kDa posiadały, aż 10-krotnie wyższe wartości relatywnej gęstości optycznej. Spośród wszystkich dziesięciu frakcji białkowych, w badanych plazmach dominowało białko o niskiej masie cząsteczkowej (10,9 kDa). Uzyskane w tym przypadku najintensywniejsze zabarwienie pasma znalazło odzwierciedlenie w najwyższej wartości relatywnej gęstości optycznej (RGO).

Na zdjęciu 5.4. przedstawiono profil elektroforetyczny białek plazmy nasienia, pobranej od dziewięciu, losowo wybranych osobników podczas pobrania siódmym.



Fot.5.4. Obraz elektroforetyczny białek plazmy nasienia uzyskany w wyniku elektroforezy denaturującej (plazmy pochodzące z pobrania siódmego)

Na podstawie uzyskanego elektroforogramu stwierdzono we wszystkich badanych plazmach obecność ośmiu frakcji białkowych. Podobnie jak w pobraniu pierwszym tak i tutaj, najslabszą intensywnością barwy charakteryzowało się pasmo odpowiadające białku o największej masie cząsteczkowej - 107,5 kDa.

Kolejnym pasmem o niskiej wartości RGO charakteryzowało się białko o masie 30,6 kDa. Pozostałe prążki odpowiadające poszczególnym frakcjom białkowym były silniej zaznaczone, przez co charakteryzowały się wyższymi wartościami relatywnej intensywności. Wyróżnione białka posiadały następujące masy cząsteczkowe: 74,8; 58,9; 34,9; 27 i 24,7 kDa. Ostatnim, wyróżnionym pasmem, było białko o najniższej wartości masy cząsteczkowej (10,9 kDa) charakteryzujące się najwyższą wartością RGO.

Uzyskane wyniki obliczonych wartości relatywnej intensywności (RGO) poddano analizie statystycznej. W celu porównania relatywnych gęstości optycznych poszczególnych frakcji w plazmach pozyskanych w pobraniu pierwszym i siódmym zastosowano test t-Studenta. W tabeli 5.11. przedstawiono wyniki zastosowanego testu.

Tab.5.11. Relatywna gęstość optyczna (RGO) prążków białkowych uzyskanych w rozdziale SDS-PAGE plazm nasienia

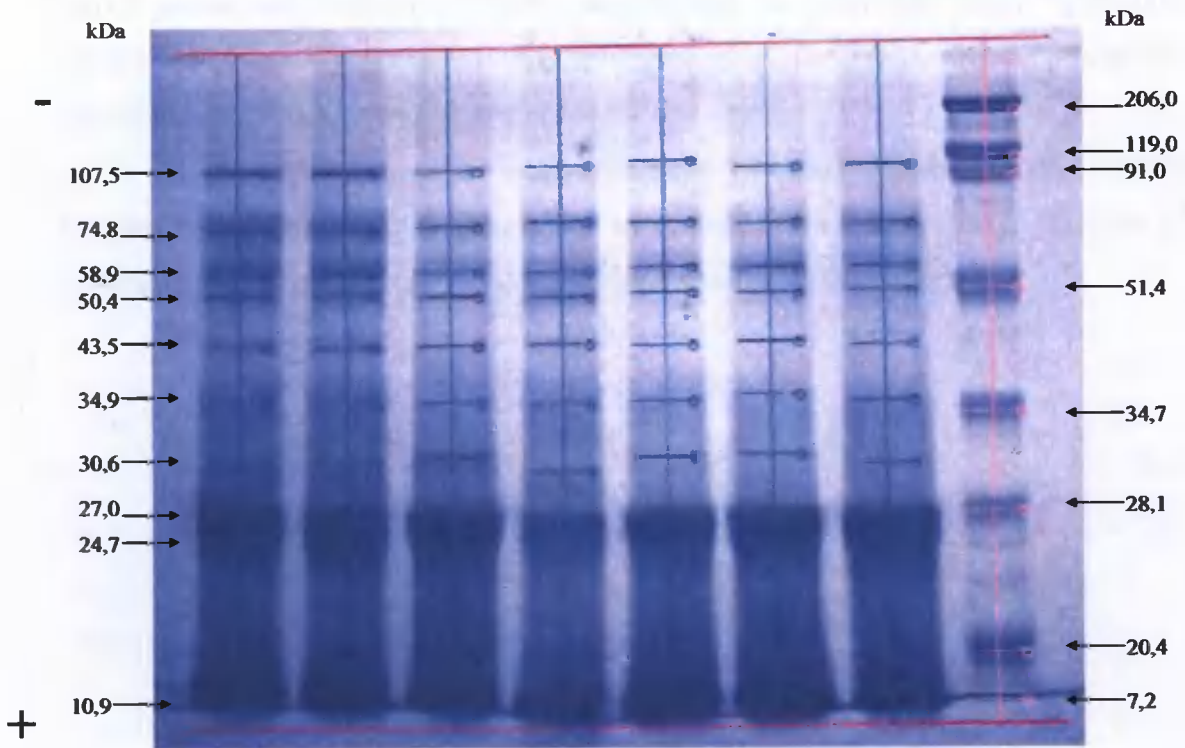
Masa cząsteczkowa [kDa]	Relatywna gęstość optyczna			
	Pobranie I		Pobranie VII	
	X_{sr}	SD	X_{sr}	SD
107,5	0,0081 ^A	0,0051	0,0017 ^A	0,0007
78,4	0,0342 ^B	0,0163	0,01 ^B	0,0057
58,9	0,0412 ^C	0,0196	0,0134 ^C	0,0079
50,4	0,0161	0,0052	-----	-----
43,5	0,0111	0,0081	-----	-----
34,9	0,0562 ^D	0,0263	0,0111 ^D	0,0063
30,6	0,0526 ^E	0,023	0,0049 ^E	0,0084
27,0	0,1424	0,0284	0,1701	0,0313
24,7	0,1834	0,0182	0,1723	0,0292
10,9	0,457 ^F	0,063	0,6167 ^F	0,0527

wartości oznaczone tymi samymi symbolami różnią się statystycznie istotnie (przy $p \leq 0,05$)

Jak wynika z tabeli 5.11. w pobraniu siódmym (ostatnim w trakcie sezonu rozrodczego), nie stwierdzono obecności prążków białkowych o masie cząsteczkowej równej 50,4 i 43,5 kDa. Pozostałe białka powtórzyły się w pierwszym i siódmym pobraniu. W plazmach nasienia pochodzących z pobrania pierwszego stwierdzono większy udział białek o masie cząsteczkowej 107,5; 78,4; 58,9; 34,9 oraz 30,6 kDa w porównaniu do plazm z pobrania ostatniego.

Z kolei plazmy uzyskane podczas pobrania nasienia w terminie siódmym posiadały więcej białek o masie cząsteczkowej równej 10,9 kDa niż plazmy z pobrania pierwszego.

Kolejny elektroforetyczny rozdział białek plazmy nasienia przedstawia zdjęcie 5.5. Tym razem analizowana plazma pochodziła od jednego osobnika, ale z wszystkich siedmiu pobrań.



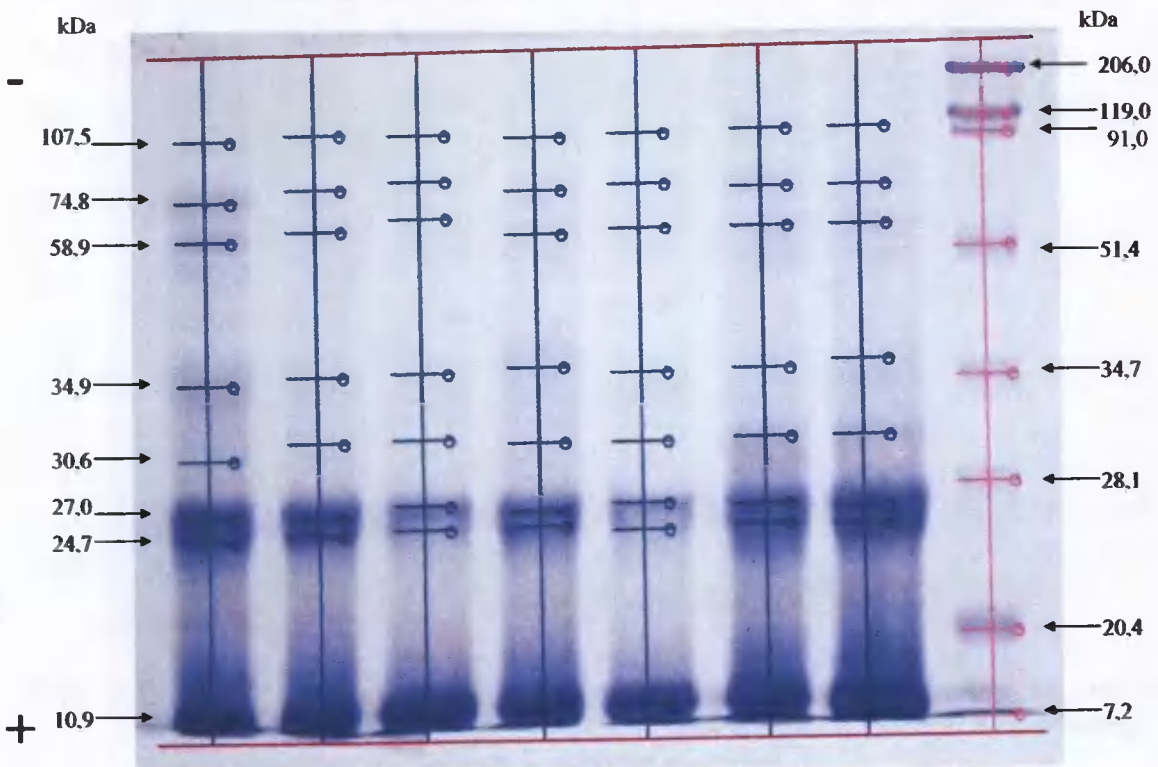
Fot. 5.5. Obraz elektroforetyczny białek plazmy nasienia uzyskany w wyniku elektroforezy denaturującej (plazmy pochodzące od jednego lisa, pierwszego z trzech losowo wybranych, z wszystkich siedmiu pobrań)

W celu wyznaczenia mas cząsteczkowych użyto tej samej mieszaniny ośmiu wzorców ($206,0 \div 7,2$ kDa). W każdym z siedmiu pobrań stwierdzono występowanie dziesięciu frakcji białkowych. Poszczególne pasma odpowiadające białkom o różnych masach cząsteczkowych charakteryzowały się, podobnie jak na obrazie elektroforetycznym z pobrania pierwszego, różnorodną intensywnością relatywną. We wszystkich pobraniach wysokie wartości RGO wykazały dwie frakcje białkowe (o masach cząsteczkowych 27 i 24,7 kDa).

Najbardziej dominujące w plazmie nasienia białko, posiadające najwyższą wartość RGO, charakteryzowało się masą cząsteczkową około 10,9 kDa. Niższe wartości relatywnej intensywności (około 0,03) uzyskano w przypadku białek o masie cząsteczkowej: 74,8; 58,9; 34,9 oraz 30,6 kDa. Z kolei najniższymi wartościami relatywnej gęstości optycznej charakteryzowały się pozostałe trzy frakcje białek o następujących masach: 107,5; 50,4 oraz 43,5 kDa.

Porównując poszczególne pobrania ze sobą, można stwierdzić, iż plazma pochodząca z dwóch pierwszych terminów pobrania, bogata była we wszystkie wyżej wymienione frakcje białkowe. Wyróżnione białka występowały w ilości zdecydowanie większej, aniżeli w pozostałych pobraniach.

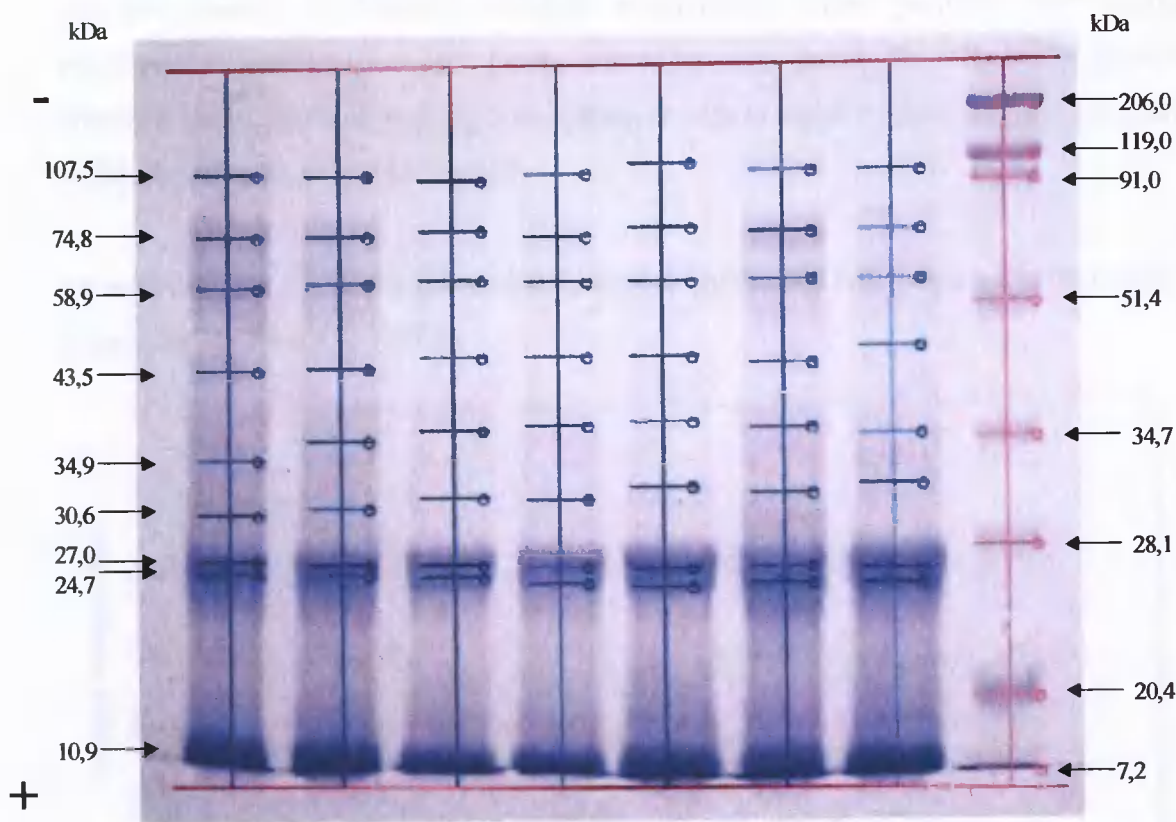
W analogiczny sposób przeprowadzono rozdział białek plazmy nasienia kolejnego osobnika. W tym przypadku obraz elektroforetyczny frakcji białkowych uzyskany w wyniku elektroforezy denaturującej przedstawia fotografia 5.6.



Fot. 5.6. Obraz elektroforetyczny białek plazmy nasienia uzyskany w wyniku elektroforezy denaturującej (plazmy pochodzące od jednego lisa, drugiego z trzech losowo wybranych, z wszystkich siedmiu pobrań)

Przeprowadzona elektroforeza pozwoliła wyróżnić we wszystkich pobraniach, osiem frakcji białkowych. W badanych plazmach, białka o masie: 27 i 24,7 kDa charakteryzowały się wysokimi wartościami relatywnej gęstości optycznej, a białko o najniższej masie cząsteczkowej (10,9 kDa) osiągnęło najwyższą wartość RGO. Oprócz wymienionych frakcji, duży udział w plazmie stanowiły białka o masach: 74,8 oraz 58,9 kDa. Zdecydowanie niższymi wartościami RGO charakteryzowały się białka o następujących masach: 107,5; 34,9 oraz 30,6 kDa.

Obraz elektroforetyczny frakcji białkowych plazmy nasienia uzyskany w wyniku elektroforezy denaturującej (SDS-PAGE) przedstawia zdjęcie 5.7. Rozdzielane plazmy pochodziły od kolejnego osobnika z siedmiu terminów pobrań.



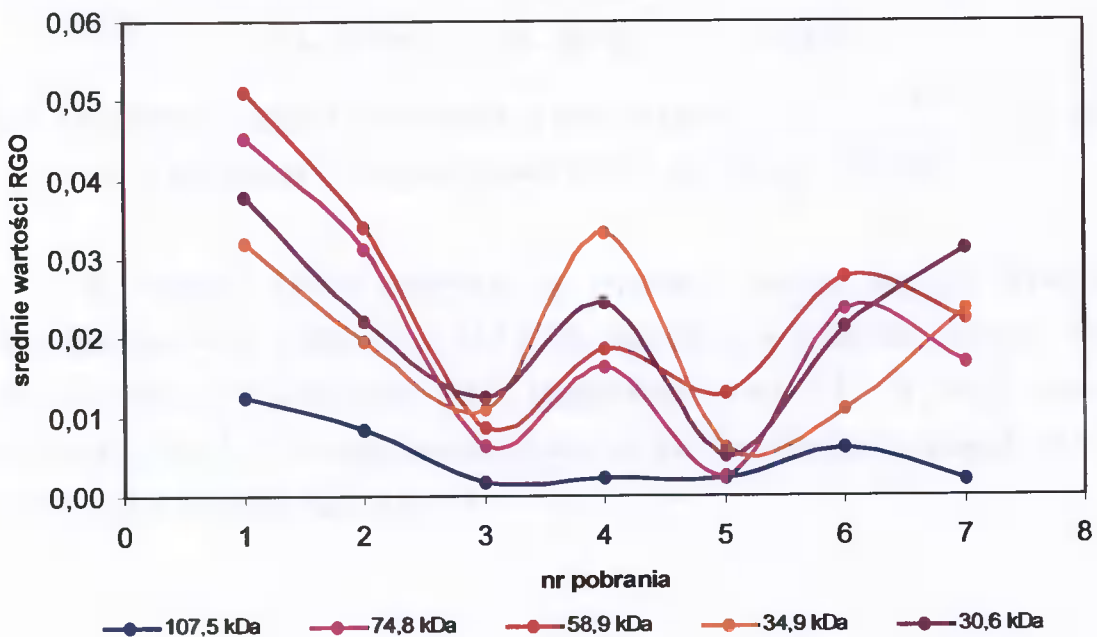
Fot. 5.7. Obraz elektroforetyczny białek plazmy nasienia uzyskany w wyniku elektroforezy denaturującej (plazmy pochodzące od jednego lisa, trzeciego z trzech losowo wybranych, z wszystkich siedmiu)

W każdej badanej plazmie stwierdzono obecność dziewięciu frakcji białkowych. Podobnie do poprzednio badanych osobników, tak i w tym przypadku w plazmie dominowało białko o masie cząsteczkowej 10,9 kDa.

Wysokie wartości relatywnej gęstości optycznej charakteryzują białka o masie 27 i 24,7 kDa. Pozostałe wyróżnione pasma (o masie 74,8; 58,9; 34,9 oraz 30,6 kDa) posiadają niższe wartości RGO. Z kolei najniższymi wartościami relatywnej intensywności charakteryzują się dwie frakcje białkowe (107,5 i 43,5 kDa). Porównując między pobraniami określone frakcje białek można zauważyć, że plazma z pierwszego terminu posiada większy udział wszystkich białek, aniżeli pozostałe pobrania.

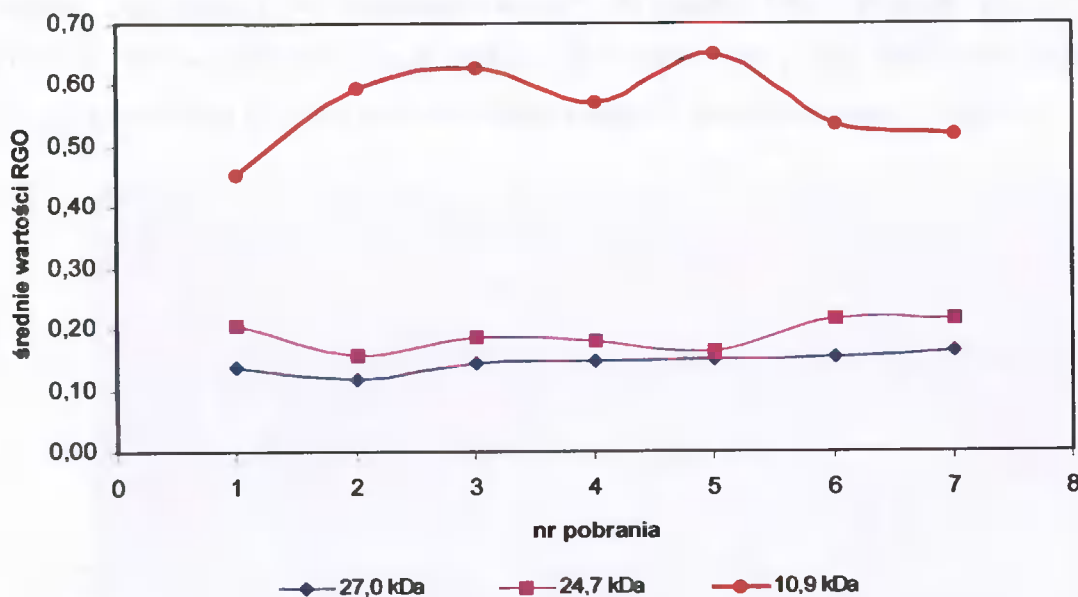
Plazmy pochodzące od trzech losowo wybranych osobników charakteryzowały się różną ilością frakcji białkowych. Spośród wszystkich rozdzielonych białek, tylko osiem z nich pojawiło się w każdej analizowanej plazmie. W celu porównania ośmiu frakcji białkowych między pobraniami, uzyskane wartości relatywnych gęstości optycznych poddano obróbce statystycznej (tab. 5.12. w załączniku). Zebrane wyniki charakteryzowały się brakiem rozkładu normalnego, nawet pomimo zastosowania przekształceń matematycznych. Użyty test nieparametryczny (test Kruskala-Wallisa) pozwolił stwierdzić brak statystycznie istotnych różnic między odpowiednimi frakcjami białek w poszczególnych pobraniach.

Na wykresie 5.8. i 5.9. przedstawiono średnie wartości RGO dla prążków białkowych w zależności od terminu pobrania.



Ryc. 5.8. Średnie wartości RGO białek o masie cząsteczkowej: 107,5; 74,8; 58,9; 34,9 i 30,6 kDa wyróżnionych w plazmach trzech losowo wybranych osobników

Białka o wysokich masach cząsteczkowych (107,5÷30,6 kDa) charakteryzowały się stosunkowo niskimi średnimi wartościami relatywnej gęstości optycznej. W większości frakcji białkowych zmiana średnich RGO podczas trwania sezonu rozrodczego była dość charakterystyczna. Gwałtowny spadek RGO, odpowiadający zmniejszeniu się stężenia danej frakcji przypadał na pobranie drugie, trzecie i piąte. Natomiast w pobraniu czwartym wydzielone frakcje białkowe występowały w zdecydowanie większej ilości. Odmienny przebieg zmian wartości RGO w badanym sezonie rozrodczym charakteryzuje białko o masie cząsteczkowej 107,5 kDa (rys. 5.8.).



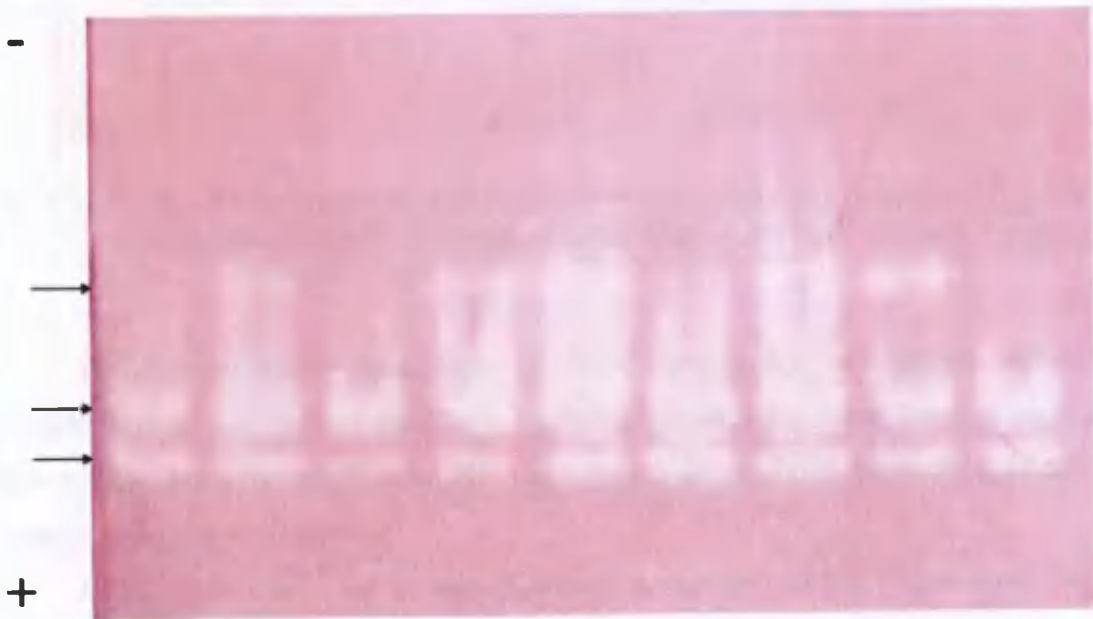
Ryc. 5.9. Średnie wartości RGO białek o masie cząsteczkowej: 27; 24,7 i 10,9 kDa wyróżnionych w plazmach trzech losowo wybranych osobników

W podobny sposób zmieniają się relatywne wartości gęstości optycznej niskocząsteczkowych białek (27 i 24,7 kDa). Najwięcej w badanych plazmach było frakcji białkowej o najmniejszej masie cząsteczkowej (rys. 5.9.). W całym sezonie rozrodczym, frakcja ta uzyskiwała najniższą wartość RGO w pierwszym pobraniu (0,45), a najwyższą w pobraniu piątym (0,65).

5.4. Rozdział elektroforetyczny form molekularnych inhibitora trypsyny

Elektroforeza przeprowadzona w warunkach natywnych pozwoliła wykryć i rozdzielić formy molekularne inhibitora trypsyny w zależności od ich wielkości i ładunku elektrycznego.

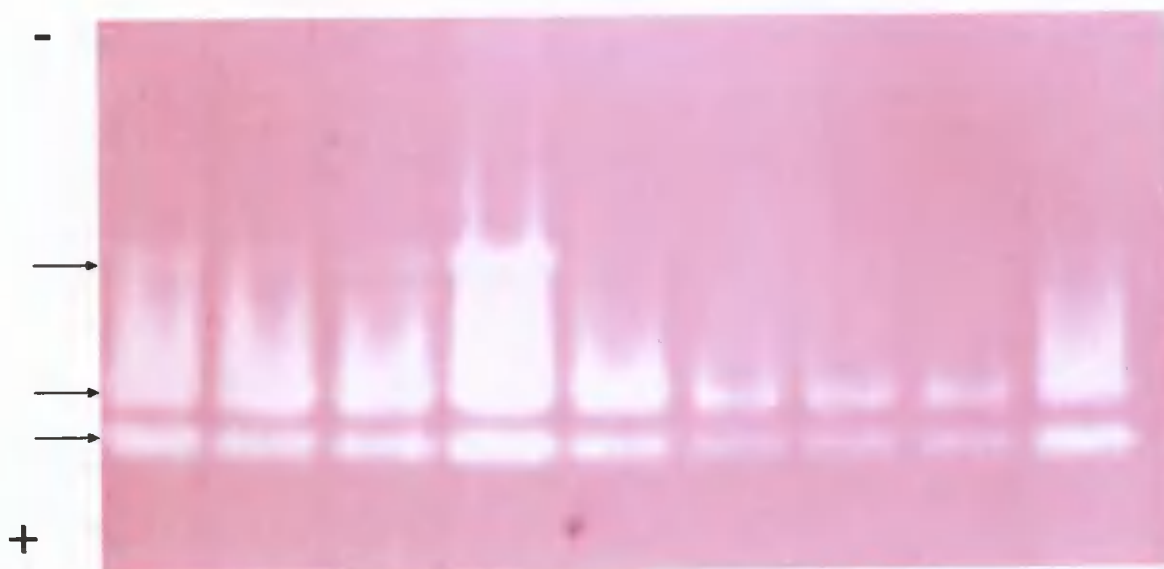
Na fotografii 5.8. przedstawiono białka o aktywności inhibitora w plazmie nasienia pochodzącej od dziewięciu losowo wybranych lisów podczas pierwszego pobrania. We wszystkich próbach wykryto trzy różne formy tego inhibitora, spośród których tylko druga forma, o średnim tempie migracji, stanowiła szerokie pasmo.



Fot. 5.8. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące od losowo wybranych lisów – pobranie pierwsze)

Podobnej ocenie poddano plazmy nasienia pozyskane od dziewięciu losowo wybranych lisów podczas ostatniego – siódmego pobrania (fot. 5.9.). Badane plazmy charakteryzowały się obecnością form molekularnych inhibitora trypsyny o największym i średnim tempie migracji. W niektórych tylko przypadkach pojawiła się dodatkowo trzecia forma tego inhibitora.

Najbardziej intensywnym, a zarazem najszerszym pasmem okazała się, podobnie jak to było w pobraniu pierwszym, forma o średnim tempie migracji.



Fot. 5.9. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące od losowo wybranych lisów – pobranie siódme)

Porównując plazmy pozyskane w dwóch pobraniach pod kątem obecności różnych form molekularnych inhibitora wyraźnie zauważa się zanik jednej z nich. Na dziewięć losowo wybranych plazm tylko w czterech przypadkach pojawiła się forma o najmniejszym tempie migracji.

Dla potwierdzenie, od którego pobrania następuje zanik tej konkretnej formy inhibitora, wykonano elektroforezę natywną dla trzech losowo wybranych osobników przez wszystkie siedem pobrań. W plazmie uzyskanej od pierwszego osobnika, w pobraniu pierwszym stwierdzono występowanie trzech molekularnych form inhibitora trypsyny. Natomiast w kolejnych trzech pobraniach zaobserwowano tylko inhibitor o średnim i największym tempie migracji. Ponownie trzy formy inhibitora trypsyny można zauważyć w pobraniu piątym i szóstym. Z kolei ostatnie pobranie charakteryzuje się obecnością tylko dwóch molekularnych form inhibitora.

Szczególnie interesujące na tle wszystkich siedmiu pobrań, wydaje się pobranie szóste, w którym występujące trzy pasma o aktywności inhibitora trypsyny są pasmami o największej intensywności (fot. 5.10).



Fot. 5.10. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące od pierwszego losowo wybranego osobnika przez wszystkie siedem pobrań)

Następna fotografia (5.11.) przedstawia profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny w plazmie nasienia kolejnego osobnika. Z elektroforogramu wynika, że trzy formy tego inhibitora obecne są w plazmie nasienia pochodzącej z pobrania pierwszego, drugiego i szóstego. W pozostałych pobraniach forma inhibitora o najwolniejszym tempie migracji zanikła. Podobnie do poprzedniego osobnika, tak i tutaj największa intensywność pasm świadczących o aktywności inhibitora trypsyny przypada na szóste pobranie (fot. 5.11).



Fot. 5.11. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące od drugiego losowo wybranego osobnika przez wszystkie siedem pobrań)

Kolejna fotografia (5.12) przedstawia profil elektroforetyczny aktywności inhibitora trypsyny w plazmie nasienia osobnika trzeciego pozyskanej podczas siedmiu pobrań.



Fot. 5.12. Profil elektroforetyczny białek o aktywności inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy natywnej (plazmy pochodzące od trzeciego losowo wybranego osobnika przez wszystkie siedem pobrań)

We wszystkich pobraniach stwierdzono występowanie dwóch różnych form inhibitora: o największym i średnim tempie migracji. Szczególnie ta ostatnia forma przedstawiona jest w postaci silnie intensywnych pasm. Dodatkowo w pierwszych czterech pobraniach można zauważyć pasmo o słabej intensywności. Widoczne pasmo świadczy o obecności trzeciej molekularnej formy badanego inhibitora.

W celu oszacowania masy molekularnej inhibitora trypsyny w plazmie nasienia lisów polarnych zastosowano elektroforezę denaturującą (SDS-PAGE). użytym markerem była mieszanina sześciu wzorców o różnych masach molekularnych (110,0 ÷ 21,4 kDa). Na zdjęciu 5.13. przedstawiono rozdzielanie elektroforetyczne inhibitora trypsyny w plazmie pochodzącej od jednego osobnika z wszystkich siedmiu pobrań. W wyniku rozdziału, we wszystkich przypadkach uzyskano dwa, różniące się zabarwieniem pasma. Jaśniejsze prążki odpowiadały aktywności inhibitora trypsyny o masie cząsteczkowej 23,6 kDa, natomiast w postaci ciemniejszych pasm widoczne było białko o aktywności esterazy (masa cząsteczkowa 26,5 kDa).



Fot. 5.12. Profil elektroforetyczny inhibitora trypsyny uzyskany w wyniku elektroforezy SDS-PAGE (plazmy pochodzące od jednego osobnika przez wszystkie siedem pobrań)

5.5. Wyniki rozrodu

Na podstawie ilości samic pokrytych, ilości samic wyszczenionych i liczby urodzonych szczeniąt obliczono skuteczność pokrycia - płodność i plenność badanej grupy zwierząt. Wybrana osiemnastka lisów *Alopex lagopus* pokryła 194 samice. Od 164 samic uzyskano 1764 szczeniąt. Na podstawie tych wartości wyznaczono płodność i plenność stada, uzyskując odpowiednio 84,54 % i 10,76.

6. DYSKUSJA WYNIKÓW

Lisy jako przedstawiciele monoestralnych zwierząt futerkowych wydają potomstwo tylko raz w roku. Wówczas na świat przychodzi średnio od 2 do 8, a czasami nawet 12 szceniąt. Chcąc lepiej wykorzystać wartościowe zwierzęta, a także zwiększyć postęp hodowlany coraz częściej na polskich fermach stosuje się zabieg inseminacji (Kubacki i in. 2005). O skuteczności sztucznego unasieniania decyduje oprócz terminu zabiegu i stosowanej techniki przede wszystkim jakość pozyskanego nasienia. W tym celu uzyskane nasienie poddaje się ocenie. Coraz częściej zakres podstawowych badań nie jest w stanie określić jednoznacznie wartości biologicznej nasienia. Stąd próba poszukania wzajemnych zależności między poszczególnymi właściwościami a budową morfologiczną nasienia.

Zebrane wartości podstawowych cech jakościowych ejakulatów badanej grupy lisów polarnych zbliżone były do norm przyjętych dla tego gatunku zwierząt (Cholewa 2000, Jarosz 1993, Mann 1958).

Jedną z cech charakteryzujących pobrane ejakulatory jest ich objętość. Z uzyskanych danych wynika, iż cecha ta charakteryzowała się stosunkowo dużą zmiennością od 0,05 do 1,5 cm³ we wszystkich analizowanych pobraniach. Dla wszystkich ejakulatów pobranych w trakcie sezonu rozrodczego obliczono średnią objętość (0,39 cm³). Wartość ta jest niższa od średniej objętości podanej przez Szeleszczuk (1998,1999) – 0,6 cm³, Barta (1999) – 0,98 cm³ czy od uzyskanej w badaniach przez Brzozowskiego (1984) 1,3÷1,9 cm³. Podobną objętością charakteryzowały się tylko ejakulatory psa gończyego 0,364 cm³ (Kojima i in. 2001).

Najniższą w badanym okresie, okazała się średnia objętość (0,27 cm³) uzyskana podczas pierwszego pobrania. W kolejnych dwóch terminach pobrań zaobserwowano wzrost objętości do około 0,53 cm³, a w następnych dwóch spadek do 0,28 cm³. Szóste i siódme pobranie to ponowny wzrost wartości objętości. Najwyższą, średnią objętością (0,57 cm³) charakteryzowały się ejakulatory w ostatnim pobraniu. Podobne wahania objętości na przestrzeni całego sezonu rozrodczego zaobserwowali w swoich badaniach Kozdrowski i Dubiel (2004).

Duża zmienność tej cechy świadczy o wpływie terminu pobrania nasienia na sprawność wydzielniczą dodatkowych gruczołów płciowych lisa. Natomiast obserwowany gwałtowny spadek objętości, przypadający na piąte pobranie może być wynikiem nadmiernej eksploatacji młodych samców co znalazło potwierdzenie w wynikach badań Bronickiej i Dembińskiego (1999).

Kolejną, ważną cechą nasienia lisa polarnego jest koncentracja plemników w ejakulacie. W badaniach własnych średnia wartość koncentracji dla całego sezonu rozrodczego wynosiła $478,0 \times 10^6/\text{cm}^3$. Wyniki zbliżone do uzyskanych w badaniach własnych zaobserwowali badając populację psów England (1999) – $423,6 \times 10^6/\text{cm}^3$ oraz Cassani i in. (2005) uzyskując wartości od 459 do $528 \times 10^6/\text{cm}^3$. Zdecydowanie niższe wartości koncentracji plemników w ejakulatach lisów przedstawił Mann (1958) – $70 \times 10^6/\text{cm}^3$. Ten sam przedział wartości dla lisów srebrzystych *Vulpes vulpes* zanotowali w swoich badaniach Boue i wsp. (2000) – $79,8 \times 10^6/\text{cm}^3$ oraz Brzozowski (1984) – $100 \times 10^6/\text{cm}^3$. Z kolei Goodrowe i in. (1998) w ejakulatach wilka rudego *Canis rufus* określił koncentrację plemników na poziomie – $146,5 \times 10^6/\text{cm}^3$. Tak różne wartości średnich koncentracji plemników prezentowane w wynikach i w dostępnej literaturze można tłumaczyć różnicami osobniczymi. Nie wykluczone, że duży wpływ na osiąganą wartość koncentracji plemników ma również sposób pobierania nasienia. Świadczą o tym wyniki przedstawione przez Barta (1999), gdzie od lisów polarnych, za pomocą metody elektroejakulacji uzyskał nasienie o średniej koncentracji wynoszącej – $317,7 \times 10^6/\text{cm}^3$.

W badaniach własnych uwagę zwraca występowanie ujemnej, statystycznie istotnej korelacji ($r = -0,4356$ przy $p \leq 0,01$) między koncentracją plemników, a objętością ejakulatu. Jednak ostatnie badania Nizańskiego (2004) dotyczące właściwości nasienia psów, tej zależności nie potwierdzają. Podobną zależność stwierdzili tylko: Solińska (2005) badając nasienie lisów polarnych ($r = -0,241$) oraz Kozdrowski i Dubiel (2004b) w badaniach nad właściwościami nasienia mieszańców dzika ze świnią domową. Współczynnik korelacji opisujący zależność przedstawioną na rys. 5.1. pozwala przypuszczać, że najwyższą koncentrację plemników zaobserwuje się w ejakulatach o najniższej objętości.

Wyniki badań własnych dotyczących stężenia jonów wodorowych w ejakulatach lisów korespondują z normami cytowanymi przez Manna, według których wartości pH nasienia powinny zawierać się w granicach od 6,2 do 6,4 (1958). Ejakulaty lisów polarnych *Alopex lagopus* zebranych przez cały czas trwania sezonu rozrodczego charakteryzowały się wartością pH na poziomie 6,12. Bardzo zbliżone wartości stężenia jonów wodorowych w nasieniu zaobserwował Brzozowski (1984) – w swych badaniach dotyczących lisów srebrzystych *Vulpes vulpes* (pH 6,2), oraz Rota i in. (1995) uzyskując wartość pH 6,3 dla badanej populacji psów. Nieco wyższe wartości pH nasienia (6,79) lisa polarnego, od uzyskanych w badaniach własnych, podaje Barta (1999). Z badań przeprowadzonych przez Szeleszczuk na nutriach (1999) wynika, iż ejakulaty posiadające niższą wartość pH charakteryzowały się wyższą koncentracją plemników. Podobną zależność zaobserwowano w badaniach własnych.

Zastosowany w badaniach własnych podział wad morfologicznych plemników, został oparty na znaczeniu poszczególnych form patologii w zaburzeniach procesu zapłodnienia. Zgodnie z klasyfikacją zmian morfologicznych zaproponowaną przez Bloma (1981), wszelkie formy patologiczne plemników podzielono na wady główne i podrzędne. Z nich – największy wpływ na obniżającą się płodność samca mają wady główne. Jak wskazują badania przeprowadzone na psach (Dubiel 1996), najczęstszymi przyczynami niepłodności oprócz azoospermii (braku plemników w ejakulacie) i oligospermii (obniżonej koncentracji plemników w ejakulacie) jest wysoki procent głównych i podrzędnych zmian w budowie plemników (teratozoospermia).

W badaniach własnych nie ujęto poszczególnych wad plemników indywidualnie, a korelacji szukano w odniesieniu do sumy anomalii z uwzględnieniem powyższego podziału.

Przeprowadzona ocena morfologiczna wykazała, że średnio 89,88 % zaobserwowanych plemników odznaczało się prawidłową budową. Zmiany pierwotne zauważono u około 1,84 % plemników. Podobne wyniki oceny morfologicznej uzyskali Kojima i in. (2001) w nasieniu psa gończego - 85,5 % plemników o prawidłowej budowie. Bardzo zbliżone wartości do uzyskanych w badaniach własnych stwierdzili w swych badaniach: Nizański (2004) – 89,1 % plemników normalnych oraz England i Ponzio (1996) ustalając dla psów zakres form o prawidłowej (normalnej) budowie od 80 do 94 %. Nieco niższy procentowy udział plemników bez anomalii w budowie, bo

około 73,6 stwierdzili Goodrowe i in. (1998) badając nasienie wilka *Canis rufus*. Natomiast Boue i in. (2000) zajmując się nasieniem lisów srebrzystych *Vulpes vulpes* określili odsetek plemników o budowie prawidłowej na poziomie 67 %. Zdecydowanie wyższe wyniki dla tego samego gatunku zwierząt uzyskał Brzozowski (1984) – 94,2 % plemników normalnych. Natomiast nasienie lisów polarnych *Alopex lagopus*, badane przez Barta (1999), charakteryzowało się znacznie większym procentowym udziałem plemników morfologicznie anormalnych. Autor ten, stwierdził występowanie form prawidłowych na poziomie 81,45 %.

Uzyskane w badaniach własnych wyniki oceny morfologicznej potwierdzają przydatność nasienia pozyskanego od badanej grupy samców do sztucznego unasiwienia. Świadczy o tym nie przewyższająca 20% zawartość plemników zmienionych morfologicznie (Wierzbicki i in. 2005).

Prowadzenie doświadczenia przez cały czas trwania sezonu rozrodczego lisów polarnych pozwoliło uchwycić odpowiedni moment terminu pobrania, uzyskując nasienie o jak najmniejszej ilości plemników z anomaliami w budowie. Z badań własnych wynika, iż najbardziej optymalnym terminem okazało się pobranie drugie (8,91%) i siódme (7,58%). Korzystne też wydaje się być pobranie trzecie (9,54%), czwarte (9,61%) i szóste (9,98%). Najwięcej zmian morfologicznych stwierdzono w nasieniu uzyskanym podczas pobrania piątego i pierwszego. Wysoki odsetek plemników z wadami w budowie (13,41%), charakteryzujący ejakulatory w piątym terminie pobrania może świadczyć o zaburzeniach w produkcji nasienia, związanych z nadmierną eksploatacją samców. Kolejnym, „nieodpowiednim” pod względem oceny morfologicznej plemników okazało się pobranie pierwsze (11,79% wszystkich wad). Wysoka ilość anomalii może w tym przypadku świadczyć o niedojrzałości układu rozrodczego samców lisa polarnego.

Wyniki uzyskane i przedstawione przez Niżańskiego (2004) potwierdzają brak występowania w badaniach własnych zależności między koncentracją plemników w ejakulacie, a procentowym udziałem plemników o prawidłowej morfologii. Stwierdzono statystycznie istotną zależność między odsetkiem plemników normalnych a objętością ejakulatu ($r= 0,2548$ przy $p \leq 0,01$).

W związku z nielicznymi dostępnymi pracami w literaturze krajowej i zagranicznej dotyczącej aktywności wybranych enzymów w plazmie nasienia lisa polarnego *Alopex lagopus* wyniki badań własnych porównano z wynikami uzyskanymi dla innych gatunków zwierząt.

W analizowanej plazmie stwierdzono obecność fosfatazy kwaśnej – enzymu biorącego udział w reakcji kapacytacji, reakcji akrosomowej, hiperaktywacji plemników, a nawet w wiązaniu plemników z osłonką przejrzystą (Umer i Sakkas, 2003). Średnia aktywność tego enzymu oznaczona w plazmie nasienia lisów polarnych wynosiła 136,66 U/dm³, podczas gdy u knurów była na poziomie 346,68 U/dm³ (Głogowski i in. 1997), a u świniodziaków – 417,17 U/dm³ (Kozdrowski 2004). Jeszcze wyższe wartości fosfatazy kwaśnej uzyskali Kozłowski i in. (2004) w swych badaniach nad wartością biologiczną nasienia indorów 611,4÷645,4 U/dm³.

Porównując uzyskane wartości aktywności fosfatazy kwaśnej na przestrzeni siedmiu pobrań, łatwo zauważyć, że plazmy pochodzące z pierwszego i drugiego pobrania charakteryzowały się największymi wartościami tego enzymu. Jako, iż jest to początek sezonu rozrodczego, to być może ejakulatory obfitowały w plemniki niedojrzałe, których błony plazmatyczne są bardziej narażone na uszkodzenia (np. podczas wirowania nasienia w celu oddzielenia plemników od plazmy). W kolejnych pobraniach zaobserwowano zmniejszanie się aktywności fosfatazy kwaśnej, aż do uzyskania najniższej wartości w pobraniu piątym. Zmniejszająca się aktywność tego enzymu, będącego markerem uszkodzeń plemnika, może sugerować o zwiększającym się odsetku dojrzałych plemników. Najniższą aktywność fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia zanotowano w ejakulatach charakteryzujących się największą liczbą morfologicznie zmienionych plemników. Niewielki „wyciek” enzymu w porównaniu z dużym odsetkiem plemników z nieprawidłową morfologią, może świadczyć o występowaniu plemników z wadami nie związanymi z akrosomem (zawinięte witki, plemniki z kroplą protoplazmatyczną itp.) lub o innym źródle fosfatazy. Z kolei w dwóch ostatnich terminach pobrania, aktywność oznaczonego enzymu wyrażona na jednostkę objętości, ponownie wzrastała. Obserwowany wzrost sugeruje zwiększanie się liczby plemników z uszkodzonym akrosomem. Być może, na wskutek długotrwałej spermatogenezy zaczynają pojawiać się w nasieniu formy niedojrzałe.

Podobnie jak w nasieniu mieszańców dzika i świni domowej (Kozdrowski 2004), tak i w badaniach własnych znaleziono istotną współzależność między aktywnością tego enzymu a koncentracją plemników ($r= 0,5676$ przy $p\leq 0,01$).

Analizując wahania aktywności fosfatazy kwaśnej na przestrzeni całego sezonu rozrodczego można wysunąć przypuszczenie, iż jej źródłem jest nie tylko gruczoł krokowy. Oprócz prostaty udział w tworzeniu tego enzymu mają również najądrza, o czym świadczy obliczony w badaniach własnych, wysoki i statystycznie istotny współczynnik korelacji między aktywnością fosfatazy kwaśnej i aktywnością fosfatazy alkalicznej ($r= 0,7043$ przy $p\leq 0,01$). Glogowski i in. (1997) badając aktywności enzymów w nasieniu knurów uzyskali istotną statystycznie zależność między aktywnością fosfatazy kwaśnej, a zawartością białka całkowitego. Podobną korelację uzyskano w badaniach własnych ($r= 0,578$ przy $p\leq 0,01$). Można zatem przypuszczać, iż o aktywności tego enzymu w plazmie nasienia lisów polarnych decyduje również wydzielina gruczołów nasiennych.

Z dostępnych danych literaturowych wynika, iż głównym źródłem fosfatazy alkalicznej są pęcherzyki nasienne (Borkowski i Strzeżek 1994). Aktywność tego enzymu stwierdzono również w najądrzach, spełniających ważną funkcję w procesie dojrzewania plemników (Strzeżek 1987, Glogowski i in. 1997). W badaniach własnych stwierdzono aktywność fosfatazy alkalicznej w plazmie nasienia lisów na poziomie $10,21 \times 10^4 \text{ U/dm}^3$. Większość autorów uzyskała w swych badaniach zdecydowanie niższe poziomy aktywności tego enzymu, od wartości rzędu $1,42 \times 10^4 \text{ U/dm}^3$ dla knurów (Glogowski i in. 1997) do $2,20 \times 10^4 \text{ U/dm}^3$ dla mieszańców dzika i świni domowej (Kozdrowski 2004). Niemniej jednak, podobnie jak w nasieniu knurów (Glogowski i in. 1997), świniodzików (Kozdrowski 2004) i dzików (Kozdrowski i Dubiel 2004a) również w nasieniu lisów znaleziono istotne statystycznie zależności między aktywnością fosfatazy alkalicznej a koncentracją plemników ($r= 0,6302$ przy $p\leq 0,01$). W badaniach własnych stwierdzono również istotną zależność między aktywnością analizowanego enzymu a zawartością białka ogólnego ($r= 0,4158$ przy $p\leq 0,01$). Obliczone korelacje potwierdzają wcześniejsze sugestie dotyczące pochodzenia tego enzymu.

W niniejszej pracy, stwierdzona zawartość białka w plazmie nasienia lisów polarnych mieściła się w przedziale od 33,23 do 48,91 mg/cm³. Z powodu braku danych na ten temat w dostępnej literaturze, uzyskane wyniki porównano z innymi gatunkami. Plazma nasienia knurów charakteryzowała się niższą wartością białka ogólnego, osiągając wartość 30,5 mg/cm³ (Glogowski i in. 1997). Podobnymi wartościami białka całkowitego, do uzyskanych w badaniach własnych, charakteryzowała się plazma nasienia indorów. Dla grupy indorów, od których tylko raz w tygodniu pobierano ejakulaty uzyskano wówczas wartość 34,62 mg/cm³. Z kolei w ejakulatach indorów częściej użytkowanych, zawartość białka kształtowała się na poziomie 46,81 mg/cm³ (Kozłowski i in. 2004).

Podczas trwania sezonu rozrodczego, w analizowanych plazmach oznaczone białko ogólne kształtowało się na zbliżonym poziomie. Uzyskane różnice w wartościach tego parametru mogą sugerować o zmieniającym się procentowym udziale poszczególnych wydzielin gruczołów dodatkowych. To właśnie wydzielane w tych gruczołach białka, pełnią fizjologiczne funkcje zarówno w układzie rozrodczym męskim (Arangasamy i in., 2005), jak i żeńskim - po zapłodnieniu (Troedsson i in., 2005). Jako, iż psowate szeroko reprezentowane przez psa i lisa nie posiadają gruczołów pęcherzykowych i opuszkowo-cewkowych (Wierzbowski 1996). Dlatego zawartość białka w plazmie nasienia będzie świadczyła o zmieniającym się udziale wydzielin z najądrzy i jedyne, dodatkowego gruczołu płciowego jakim jest gruczoł krokowy zwany inaczej prostatą (Strzeżek i Janowski 2003). O procentowym udziale wydzielin, oprócz białka, świadczy również zmieniająca się aktywność wybranych enzymów (fosfatazy kwaśnej i alkalicznej). Interesujący wydaje się fakt, iż spośród siedmiu pobrań tylko w pobraniu piątym zauważalny był gwałtowny spadek wszystkich badanych wskaźników biochemicznych. Być może odpowiedzialna za to jest zmieniająca się pora roku (zima/wiosna), a z nią związana temperatura i długość dnia świetlnego.

W celu dokładnego poznania frakcji białkowych zawartych w plazmie lisa polarnego przeprowadzono rozdziały elektroforetyczne. Wykonane profile białek plazmy nasienia pozyskanej na początku i na końcu sezonu, wskazują na różnice między pobraniami (fot. 5.3. i 5.4.).

Tę różnicę stanowi obecność w plazmach, pozyskanych podczas pierwszego pobrania, dwóch dodatkowych prążków białkowych o masie cząsteczkowej 50,4 i 43,5 kDa. Pozostałych białek, o masie 107,5 kDa; 78,4 kDa; 58,9 kDa; 34,9 kDa i 30,6 kDa, było relatywnie więcej na początku sezonu rozrodczego. Z kolei plazmy pochodzące z ostatniego terminu pobrania charakteryzowały się większym udziałem białek o masie 27 kDa; 24,7 kDa oraz 10,9 kDa. Prawdopodobnie pojawiające się na początku sezonu dodatkowe frakcje białkowe mogą być odpowiedzialne za dojrzewanie plemników. Natomiast rolę wszystkich białek plazmy nasienia może być ochrona plemników (poprzez stabilizację ich błon komórkowych).

W wyniku elektroforezy denaturującej (SDS-PAGE), w plazmach pozyskanych od trzech różnych osobników, stwierdzono obecność od 8 do 10 frakcji białkowych (fot. 5.5÷5.7.). Spośród wszystkich wydzielonych prążków białkowych, tylko osiem powtarzało się w plazmie pochodzącej z każdego z siedmiu pobrań. Wyróżnione białka charakteryzowały się następującymi masami cząsteczkowymi: 107,5; 74,8; 58,9; 34,9; 30,6; 27; 24,7 i 10,9 kDa. W plazmie nasienia lisa polarnego najwięcej, bez względu na termin pobrania, było białek niskocząsteczkowych (27; 24,7 oraz 10,9 kDa). Pozostałe prążki, odpowiadające kolejnym frakcjom białkowym, pojawiały się w poszczególnych pobraniach w różnym stężeniu. Uzyskane wartości RGO dla konkretnej masy cząsteczkowej nie różniły się między pobraniami statystycznie istotnie.

W procesie regulacji ruchu plemników, w koagulacji i upłynnianiu nasienia, jak również w degradacji starzejących się plemników w najądrzach biorą udział specyficzne enzymy proteolityczne (Kowalski i in. 2003; Wojtczak i in. 2003). Ich aktywność regulowana jest przez wiele inhibitorów (Lee i in. 1989).

W wyniku elektroforezy (SDS-PAGE), przeprowadzonej celem rozdzielenia i określenia mas cząsteczkowych enzymów proteolitycznych, w plazmie nasienia lisa polarnego stwierdzono obecność dwóch pasm. Jednym z nich było białko o aktywności esterazy (26,5 kDa). Drugie wykryte pasmo aktywności proteolitycznej (23,6 kDa) wykazywało cechy proteiny serynowej. Masa cząsteczkowa tego pasma podobna była do masy trypsyny, która w organizmach ssaków aktywuje i degradowuje inne enzymy (Paju i in. 2000; Wojtczak i in. 2003).

W niniejszej pracy oznaczona aktywność inhibitora trypsyny była najniższa w piątym terminie pobrania ($2089,83 \text{ U/dm}^3$). Świadczyć to może o najmniejszej ilości akrosyny wydzielonej z uszkodzonych plemników. Potwierdza to wcześniejsze sugestie, iż nasienie z tego okresu, pomimo największej ilości zmian morfologicznych, charakteryzowało się najmniejszą liczbą plemników z uszkodzonym akrosomem. Uzyskane wartości aktywności inhibitora trypsyny skorelowano z aktywnością fosfatazy kwaśnej i alkalicznej uzyskując wysoko istotne statystycznie współczynniki (odpowiednio 0,6507 i 0,8100 przy $p \leq 0,01$). Ponadto w badaniach własnych, stwierdzono występowanie wysoko statystycznie istotnej zależności między aktywnością inhibitora trypsyny, a koncentracją plemników ($r=0,6516$ przy $p \leq 0,01$). Jako, iż aktywność tego inhibitora skorelowana jest również z zawartością białka ogólnego, można przypuszczać, że chroni ona plemniki przed proteolizą podczas przebywania ich w nasieniowodach (Ciereszko i in. 1998).

Przeprowadzona elektroforeza natywna (bez środków denaturujących) wykazała w plazmie nasienia obecność trzech form aktywności inhibitora trypsyny, różniących się tempem migracji (Kotłowska i in. 2005). Każda plazma uzyskana podczas pierwszego pobrania charakteryzowała się występowaniem wszystkich trzech form molekularnych inhibitora, natomiast w plazmach z pobrania siódmego nie zawsze występowała forma o najmniejszym tempie migracji. W celu stwierdzenia, od którego pobrania następuje zanik tej formy, wykonano obrazy elektroforetyczne aktywności inhibitora dla trzech różnych osobników przez wszystkie siedem pobrań. Z uzyskanych elektroforogramów wynika, że trzy formy pojawiają się w plazmie zawsze na początku sezonu rozrodczego. W późniejszych pobraniach forma inhibitora o najmniejszej ruchliwości pojawiała się sporadycznie. Z plazmie pochodzącej od dwóch, na trzech losowo wybranych osobników, forma ta stanowiła pasmo o największej intensywności. Przypuszczalnie plazmy te zostały zanieczyszczone krwią lub moczem, gdyż właśnie te wydzieliny są bogatym źródłem proteinaz. Sugestia ta wydaje się prawdopodobna, gdyż na 126 pobranych ejakulatów tylko w siedmiu przypadkach nasienie miało barwę biało-żółtą. W pozostałych przypadkach ejakulaty charakteryzowały się barwą białą i mleczną konsystencją. Zastosowana metoda rozdzielu elektroforetycznego proteinaz charakteryzuje się dużą czułością, dzięki czemu nawet drobne zanieczyszczenie nasienia może być wykryte na żelu.

Badane pod względem jakości nasienia stado osiemnastu osobników charakteryzowało się skutecznością pokrycia na poziomie 84,54 %. Uzyskana wartość płodności korespondowała z wynikami uzyskanymi przez Szeleszczuk i Niedbałą (1999) – od 83,5 do 100% oraz przez Janickiego i in. (2006) – 81,82 do 100%. W dostępnej literaturze, podobnym wskaźnikiem płodności charakteryzowały się populacje lisów polarnych badane przez Zonia i in. (2000) – zakres od 85,7 do 100% oraz przez Brzozowskiego (1995) – średnio 86,75%.

Kolejnym wskaźnikiem użytkowości rozplodowej badanych lisów polarnych była plenność, która w badaniach własnych kształtowała się na poziomie 10,76 szczeniąt od jednej samicy. Nieco niższe wartości podają Szeleszczuk i Niedbała (1999) – od 6,5 do 9,29, Zoń i in. (2000) od 6,6 do 7,5 oraz Brzozowski – średnio 8,7. Uzyskane w badaniach własnych wartości plenności i odsetek samic pokrytych świadczą o dobrej jakości nasienia użytego do inseminacji, o dobrze zbilansowanym żywieniu (zwłaszcza w okresach przygotowania do rozplodu i odchovu młodych) i o odpowiednich warunkach zoohigienicznych zapewnionych na fermie (Szeleszczuk i Niedbała 1999).

7. WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki badań potwierdzają zakładaną hipotezę o zmianie jakości nasienia lisa polarnego w trakcie sezonu rozrodczego. W zależności od terminu pobrania ejakulatów, analizowane parametry biochemiczne różniły się statycznie istotnie.
2. Ejakulatory lisów o najmniejszej objętości charakteryzowały się najwyższą koncentracją plemników. Potwierdza to ujemny współczynnik korelacji Spearmana ($r = 0,4356$). Analiza zmian aktywności fosfatazy kwaśnej pozwala przypuszczać, iż enzym ten pochodzi z gruczołu krokowego i najądrzy. Świadczy o tym wysoko statystycznie istotny współczynnik korelacji z fosfatazą alkaliczną $r=0,7043$ (przy $p \leq 0,01$). Z kolei stwierdzona zależność między koncentracją plemników, a aktywnością fosfatazy alkalicznej w plazmie nasienia potwierdza, iż enzym ten pochodzi wyłącznie z najądrzy.
3. Bez względu na termin pobrania, w plazmie nasienia lisów polarnych stwierdzono obecność białek o masach cząsteczkowych: 107,5; 74,8; 58,9; 34,9; 30,6; 27; 24,7 oraz 10,9 kDa. Spośród, których największym udziałem charakteryzowały się białka niskocząsteczkowe.
4. W plazmie nasienia lisów polarnych wykazano obecność inhibitorów enzymów proteolitycznych, które oprócz zdolności hamowania aktywności trypsyny wołowej, chronią akrosom przed działaniem proteinaz.
5. Badana populacja lisów charakteryzowała się wysokim poziomem reprodukcji. Kształująca się na poziomie 84,54% płodność, a także plenność wynosząca 10,76 szczeniąt od jednej samicy świadczą o wysokiej wartości biologicznej nasienia.



8. PIŚMIENNICTWO

Arangasamy A., Singh L. P., Ahmed N., Ansari M. R., Ram G. C., 2005: Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa, *Anim. Reprod. Sci.*, 90(3-4), s. 243-254

Barta M., 1999: Výskyt morfologicky zmenených spermií v ejakuláte lišiakov (*Alopex lagopus*), *Poľnohospodárstvo, Ročník 45, číslo 1*, s. 71-76

Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J., 1946: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, *J. Biol.Chem.*, 164, s.321-325

Bielański W., 1977: Rozród zwierząt, Państw. Wyd. Rol. I Leśne, Warszawa

Bloom E., 1981: Ocena morfologiczna wad plemników buhaja. II. Propozycja nowej klasyfikacji wad plemników, *Med. Wet.*, 37 nr 4, s. 239-242

Boue F., Delhomme A., Chaffaux S., 2000: Reproductive management of silver foxes (*Vulpes vulpes*) in captivity, *Theriogenology*, 53, s. 1717-1728

Bronicka A., Dembiński Z., 1999: Aktualne kryteria oceny i uwarunkowania jakości nasienia knura, *Med. Wet.* 55 (7), s. 436-439

Brzozowski M., 1984: Pobieranie, ocena i przechowywanie nasienia lisów srebrzystych (*Vulpes vulpes*) oraz próba oceny samców jako dawców nasienia, *Rocz. Nauk. Zoot.* T.11, z. 2, s. 31-39

Cardoso R.C.S., Silva A.R., Uchoa D.C., Silva L.D.M., 2003: Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59, s. 743-751

Cassani P., Beconi M.T., O'Flaherty C., 2005: Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen, *Anim. Reprod. Sci.*, 86, s. 163-173

Cholewa R., 1988: Chów i hodowla lisów, Państw. Wyd. Rol. i Leśne, Warszawa

Cholewa R., 2000: Chów i hodowla zwierząt futerkowych, Wyd. AR w Poznaniu

Christiansen I.J., Schmidt M., Mitchell T.C., 1985: Reproduction in Foxes, VI. Continued Investigations of Deep-Freezing of semen. The Royal Veterinary and Agricultural University, Sterility Research Institute, Annual Report, s. 78-83.

Ciereszko A., Piros B., Dąbrowski K., Kucharczyk D., Łuczyński M. J., Dobosz S., Glogowski J., 1998: Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood. *Journal of Fish Biology*, 53, s.1292-1305

Czczot H., Strzeżek J., 1986: Kriobiochemiczne zmiany plemników młodych buhajów podczas prób mrożenia w ciekłym azocie, *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* z. 263, s. 97-110

Čechova D., 1988: Enzymy proteolityczne w akrosomie plemnika, Materiały letniej szkoły młodych pracowników nauki nt: „Fizjologiczne, biochemiczne i immunologiczne zagadnienia męskiego układu rozrodczego oraz nasienia”, *Biuletyn Informacyjny ART – Olsztyn*, nr 25, s. 97-104

Dubiel A., 1996: Zaburzenia płodności psów reproduktorów, „*Andrologia w rozrodzie zwierząt*” Uroczysta Sesja Naukowa poświęcona prof. S. Wierzbowskiemu, Instytut Zootechniki i Polska Akademia Umiejętności, Kraków, s. 219-221

England G.C.W., 1999: Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation, *Theriogenology* 52, s. 981-986

Farstad W., 2000: Assisted reproductive technology in canid species, *Theriogenology* 53, s. 175-186

Farstad W., 1998: Reproduction In foxes: current research and future challenges, *Anim.Reprod. Sci.*,53, 35-42.

Farstad W., 2000: Current state in biotechnology in canine and feline reproduction, *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, s. 375-387

Farstad W., 1996: Semen cryopreservation in dogs and foxes, *Anim. Reprod. Sci.*, 42, s. 251-260

Farstad W., Fougner J.A., Torres C.G., 1992: The optimum time for single artificial insemination of blue fox vixens (*Alopex lagopus*) with frozen-thawed semen from silver foxes (*Vulpes vulpes*), *Theriogenology* 38, s. 853-865

Fougner J.A., 1989: Artificial insemination in fox breeding, *J. Reprod. Fert., Suppl.* 39, s. 317-323.

Glogowski J., Demianowicz W., Piros B., Ciereszko A., 1998: Determination of acrosin activity of boar spermatozoa by the clinical method: optimization of the assay and changes during short-term storage of semen, *Theriogenology*, 50, s. 861-872.

Glogowski J., Falkowski J., Rotkiewicz T., 1997: Aktywność fosfataz w plazmie nasienia knurów w cyklu rocznym i ich związek z podstawowymi wyznacznikami jakościowymi ejakulatów, *Rocz. Nauk. Zoot., Instytut Zootechniki Kraków*, T. 24, z. 3, s. 85-95

Goodrowe K.L., Hay M.A., Platz C.C., Behrns S.K., Jones M.H., Waddell W.T., 1998: Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa, Anim. Reprod. Sci., 53, s. 299-308

Janicki B., Solińska J., Łakota P., 2006: Ocena jakości i wartości biologicznej nasienia lisów polarnych w sezonie rozrodczym, Med. Wet. (przyjęta do druku)

Jarosz S., 1993: Hodowla zwierząt futerkowych, Wydaw. Nauk. PWN Warszawa – Kraków

Jarosz S., 1996: Unasiennianie lisów, „Andrologia w rozrodzie zwierząt” Uroczysta Sesja Naukowa poświęcona prof. S. Wierzbowskiemu, Instytut Zootechniki i Polska Akademia Umiejętności, Kraków, s. 209-218

Jarosz S., Szeleszczuk O., Zoń A., 1991: Pobieranie, ocena i konserwacja nasienia lisów niebieskich, Biuletyn Regionalny ZUP AR Kraków, nr 292, s. 199-208

Kojima E., Tsuruga H., Komatsu T., Murase T., Tsubota T., Kita I., 2001: Characterization os semen collected from beagles and captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*), Theriogenology, 55, s. 711-731

Kotłowska M., Kowalski R., Glogowski J., Jankowski J., Ciereszko A., 2005: Gelatinases and serine proteinase inhibitors of seminal plasma and the reproductiven tract of turkey (*Meleagris gallopavo*), Theriogenology, 63, s. 1667-1681

Kowalski R., Wojtczak M., Glogowski J., Ciereszko A., 2003: Gelatinolytic and anti-trypsin activities in seminal plasma of common carp: relationship to blood, skin mucus and spermatozoa, Aquat. Living Resour. 16, s. 438-444

Kozdrowski R., 2004: Aktywność aminotransferazy asparaginowej, fosfatazy alkalicznej i kwaśnej w plazmie nasienia mieszańców dzika i świni domowej w cyklu rocznym, Acta Sci. Pol., Medicina Veterinaria 3 (2), s. 79-85

Kozdrowski R., Dubiel A., 2004a: The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa L.*) semen, Anim. Reprod. Sci., 80 s. 281-289

Kozdrowski R., Dubiel A., 2004b: Właściwości nasienia mieszańców dzika ze świnią domową w cyklu rocznym, Med. Wet., 60 (1), s.57-61

Kozłowski K., Jankowski J., Głogowski J., Ciereszko A., 2004: Wpływ intensywności użytkowania rozplodowego oraz wieku indorów na jakość i wartość biologiczną nasienia, Med. Wet., 60 (1), s. 66-69

Kubacki P., Smektała I., Kubacki S., 2005: Analiza cech reprodukcyjnych lisów polarnych w zależności od wieku samicy i typu krzywej oporności śluzu pochwowego, Acta Sci. Pol., Zootechnica 4(2), s. 67-76

Laemmler U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, Nature, 227, s. 680-685.

Lee C., Keefer M., Zhao Z. W., Kroes R., Berg L., Liu X. X., Sensibar J., 1989: Demonstration of the role of prostate-specific antigen in semen liquefaction by two-dimensional electrophoresis, Journal of Andrology, 10, s. 432-438

Lorek M.O., Gugolek A., Grzechnik M., 1999: Ocena wyników uzyskanych podczas wdrażania inseminacji na fermie lisów polarnych, Zesz. Nauk. PTZ 42, s. 364-366

Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L., Randall R.J., 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, s. 265-275

Madeyska-Lewandowska A., Brzozowski M., 1983: Badanie elektroforetyczne surowicy krwi oraz plazmy nasienia lisów srebrzystych, Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln., PWN Warszawa, z. 302, s. 41-45

Mann T., 1958: Biochemia nasienia, Państw. Wyd. Roln. i Leśne, Warszawa

Morstin J., 1996: Anomalie plemników samców zwierząt gospodarskich i ich związek z płodnością nasienia, „Andrologia w rozrodzie zwierząt” Uroczysta Sesja Naukowa poświęcona prof. S. Wierzbowskiemu, Instytut Zootechniki i Polska Akademia Umiejętności, Kraków, s. 58-67

Nizański W., 2004: Zależności pomiędzy wybranymi właściwościami plemników psa w nasieniu poddanym konserwacji w niskich temperaturach, *Med. Wet.*, 60 (5), s. 537-543

Nizański W., Bielas W., 2003: Wpływ Equex stm na wybrane właściwości plemników psa w nasieniu poddanym konserwacji w niskich temperaturach, *Med. Wet.*, 59 (8), s. 691-695

Praca zbiorowa od redakcją J. Monkiewicza, 1995: Rozród zwierząt gospodarskich, AR Wrocław

Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C., 1995: Effects of seminal plasma and three extenders of canine semen stored at 4°C, *Theriogenology*, 44, s. 885-900

Salzbereger Z., Lewin L.M., Shalgi R., 1992: Loss of acid phosphatase from rat spermatozoa as a method for assessing the acrosome reaction, *Andrologia*, 24, s. 155-159

Silva A.R., Cardoso R.C.S., Uchoa D.C., Silva L.D.M., 2003: Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process, *Theriogenology*, 59, s. 821-829

Solińska J., 2005: Wartość biologiczna nasienia lisa polarnego (*Alopex lagopus*) w sezonie rozrodczym, Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, Praca doktorska, s. 63

Strzeżek J., 1988: Struktury morfologiczne plemnika i ich funkcja biochemiczna, Materiały letniej szkoły młodych pracowników nauki nt: „Fizjologiczne, biochemiczne i immunologiczne zagadnienia męskiego układu rozrodczego oraz nasienia”, Biuletyn Informacyjny ART – Olsztyn, nr 25, s. 67-96

Strzeżek J., 1987: Wybrane układy enzymatyczne nasienia zwierząt gospodarskich w aspekcie doskonalenia jego konserwacji i płodności samców, Zesz. Prob. Post. Nauk. Rol., 340, s. 9-40,

Strzeżek J., Sławeta R., 1984: Chemiczne i morfologiczne zmiany w nasieniu knura podczas przechowywania w temperaturze +15°C do +18°C, Med. Wet. 40 (8), s. 495-499

Strzeżek J., Wołos A., 1986: Ćwiczenia z biochemii. Wyd. ART. Olsztyn

Strzeżek R., Janowski T., 2003: Markery enzymatyczne gruczołu krokowego psa, Med. Wet. 59 (1), s. 6-9

Szeleszczuk O., 1998: Metody pozyskiwania i konserwacji nasienia oraz unasienniania hodowlanych lisów polarnych i pospolitych, Mag. Wet., 3,(7), s. 186-189

Szeleszczuk O., 1999: Unasienianie lisów polarnych i pospolitych, Hodowca zwierząt futerkowych, nr 1(3), s.17-18

Szeleszczuk O., 2001: Czynniki wpływające na wyniki rozrodu i odchowu mięsożernych zwierząt futerkowych, Prz. Hod., nr 11, s. 21-23

Szeleszczuk O., 2003: Skład biochemiczny nasienia i wydzieliny dodatkowych gruczołów płciowych samców nutrii, Med. Wet. 59 (9), s. 787-791

Szeleszczuk O., Śmiełewska-Łoś E., Mizak B., 2004: Zdrowotność i płodność lisów polarnych w świetle badań własnych, Mag. Wet, nr 92, vol. 13, s. 54-57

Szeleszczuk O., Niedbala P., 1999: Zaburzenia w Płodności i plenności lisów polarnych niebieskich, Zesz. Nauk. PTZ, 42, s. 255-265

Troedsson M. H., Desvousges A., Alghamdi A. S., Dahms B., Dow C. A., Hayna J., Valesco R., Collahan P. T., Macpherson M. L., Pozor M., Buhi W. C., 2005: Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. Anim. Reprod. Sci., 89(1-4), s. 171-86

Uriel J., Berges J., 1968: Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels, Nature, 218, s. 578-580

Urner F., Sakkas D., 2003: Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa, Reproduction, 125, s. 17-26

Valtonen M., 1991: Artificial insemination in foxes, Zesz. Nauk. ATR Bydgoszcz, nr 175. Zootechnika (20), s. 109-114

Wierzbicki H., Przysiecki P., Gorajewska E., Filistowicz A., 2005: Procesy adaptacyjne lisa polarnego w zmienionym środowisku, Med. Wet. 61 (8), s. 914-918

Wierzbowski S., 1996: Andrologia, Wyd. Platan, Kraków

Wojtczak M., Glogowski J., Koldras M., Kucharczyk D., Ciereszko A., 2003: Characterization of protease inhibitors of seminal plasma of cyprinids, Aquat. Living Resour. 16, s. 461-465

Yıldız C., Kaya A., Aksoy^a M., Tekeli T., 2000: Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing, Theriogenology, 54, s. 579-585

Zalewski W., Sochacka Z., Stryjecki J., 1984: Udana próba zastosowania nasienia mrożonego u lisów w Polsce, Hod. Drob. Inwent., 7-8, s. 17-18

Zoń A., Bielański P., Sławoń J., Zając J., 2000: Charakterystyka wyników produkcyjnych lisów polarnych niebieskich na tle ich warunków utrzymania i dobrostanu, Zesz. Nauk. PTZ, 53, s. 7-13

9. ZAŁĄCZNIK

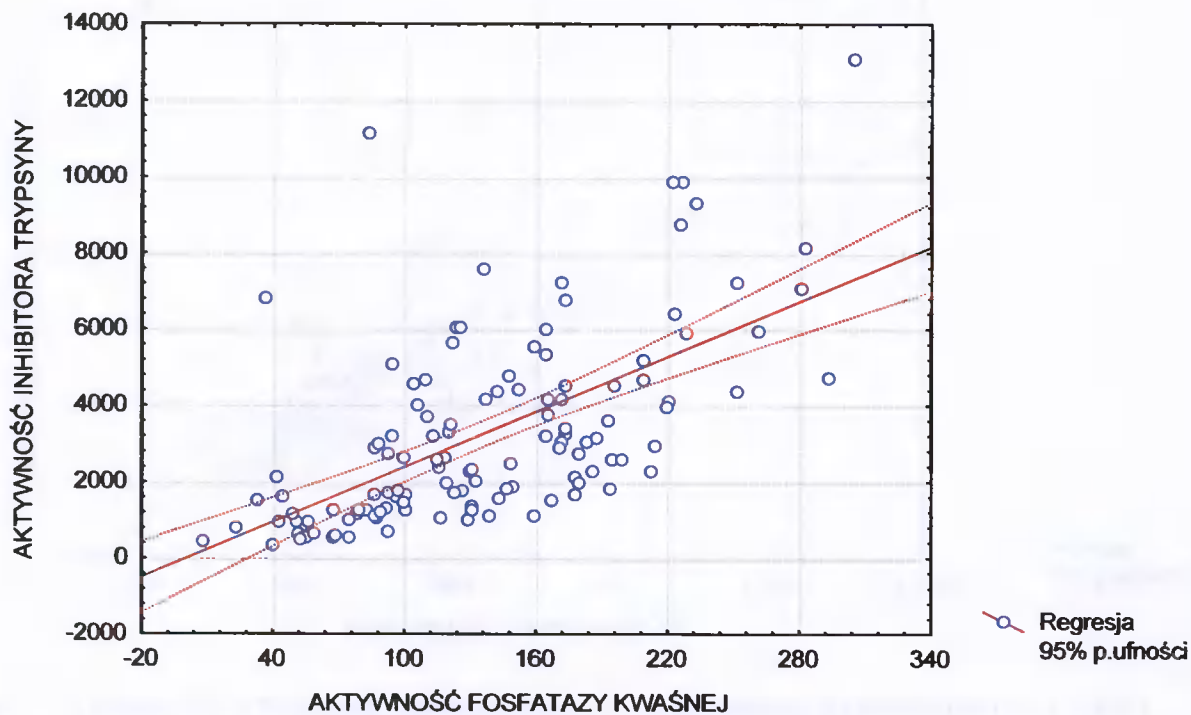
Tab. 5.4. Zawartość białka ogólnego i aktywności enzymów w plazmie nasienia lisa polarnego w sezonie rozrodczym

Cecha	Miary statyst.	Numer pobrania							
		ogółem n=126	1 n=18	2 n=18	3 n=18	4 n=18	5 n=18	6 n=18	7 n=18
aktywność fosfatazy kwaśnej [U/dm ³]	\bar{x}	136,66	171,46	173,04	116,97	124,29	82,11	165,38	126,87
	mediana	129,77	163,90	181,19	117,72	123,20	85,57	153,44	117,14
	min	7,11	110,19	55,33	36,32	23,05	7,11	52,01	87,10
	max.	304,75	260,99	251,17	223,10	220,16	130,35	304,75	208,04
aktywność fosfatazy alkalicznej $\times 10^4$ [U/dm ³]	\bar{x}	10,21	16,60	16,33	10,58	6,55	1,51	9,64	8,04
	mediana	7,21	14,95	15,95	10,27	6,69	0,20	4,82	7,51
	min	0,0039	0,5121	0,0577	4741,41	0,2141	0,0039	0,0658	0,9641
	max.	43,03	43,04	41,15	31,95	13,11	13,66	36,82	18,99
aktywność inhibitora [U/dm ³]	\bar{x}	3305,71	4296,48	4259,87	3397,20	2167,08	2089,83	4156,10	2773,23
	mediana	2683,00	4184,82	3881,7	3161,15	1578,55	1332,35	3139,95	2608,2
	min	368,85	2033,50	971,80	555,75	664,20	368,85	489,15	1204,20
	max.	13098,30	8764,40	9897,20	6827,60	5990,20	11164,00	13098,30	7571,20
zawartość białka ogólnego [mg/cm ³]	\bar{x}	44,14	45,32	48,91	42,67	42,25	33,23	48,51	47,97
	mediana	45,34	44,00	50,87	40,89	38,17	37,38	48,63	48,31
	min	3,73	30,59	33,15	25,32	7,60	3,73	31,39	21,97
	max.	72,74	59,17	62,52	72,74	70,82	48,63	67,31	67,31

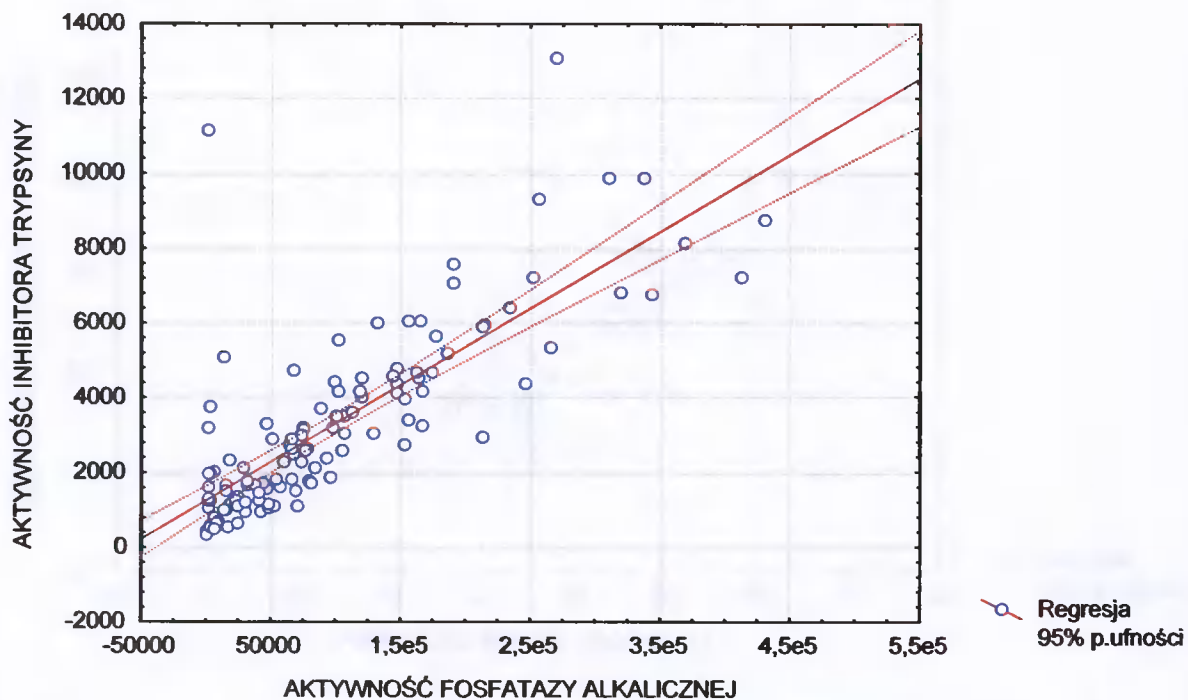
Tab. 5.12. Relatywna gęstość optyczna (RGO) prążków białkowych uzyskanych w rozdziale SDS-PAGE plazm nasienia trzech losowo wybranych osobników lisa polarnego w sezonie rozrodczym

Masa prążka [kDa]	Miary statyst.	Terminy pobrania nasienia						
		1	2	3	4	5	6	7
107,5	\bar{x}_{sr}	0,012	0,008	0,002	0,003	0,002	0,006	0,002
	mediana	0,011	0,008	0,001	0,002	0,003	0,004	0,002
74,8	\bar{x}_{sr}	0,045	0,031	0,006	0,016	0,003	0,024	0,017
	mediana	0,032	0,044	0,005	0,012	0,003	0,014	0,015
58,9	\bar{x}_{sr}	0,051	0,034	0,009	0,019	0,013	0,028	0,022
	mediana	0,036	0,045	0,009	0,020	0,012	0,026	0,022
34,9	\bar{x}_{sr}	0,032	0,020	0,011	0,033	0,006	0,011	0,024
	mediana	0,028	0,003	0,007	0,039	0,003	0,003	0,025
30,6	\bar{x}_{sr}	0,038	0,022	0,013	0,024	0,005	0,021	0,031
	mediana	0,051	0,006	0,001	0,020	0,001	0,030	0,039
27,0	\bar{x}_{sr}	0,138	0,118	0,144	0,146	0,153	0,153	0,163
	mediana	0,146	0,095	0,156	0,144	0,135	0,160	0,160
24,7	\bar{x}_{sr}	0,208	0,156	0,187	0,181	0,166	0,216	0,216
	mediana	0,207	0,140	0,227	0,187	0,175	0,208	0,228
10,9	\bar{x}_{sr}	0,452	0,595	0,628	0,572	0,652	0,537	0,520
	mediana	0,511	0,657	0,554	0,561	0,654	0,563	0,525

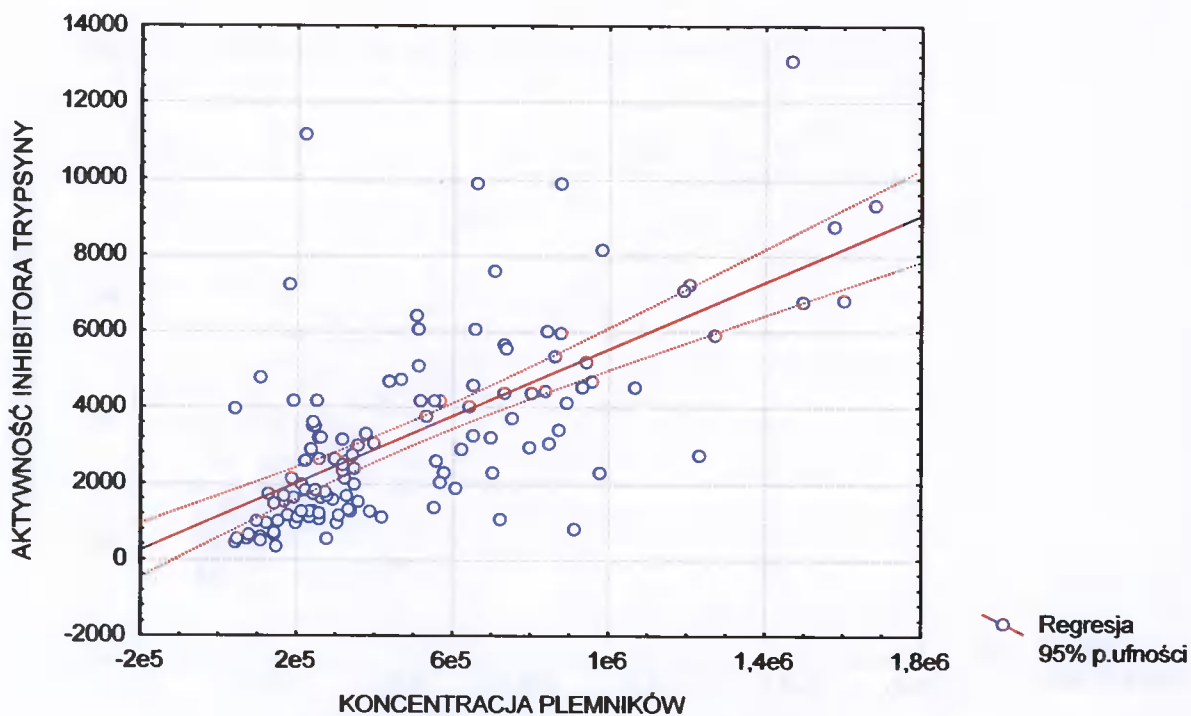
Poniższe wykresy przedstawiają zależności między poszczególnymi parametrami biochemicznymi o wysokim (powyżej 0,5) współczynniku korelacji.



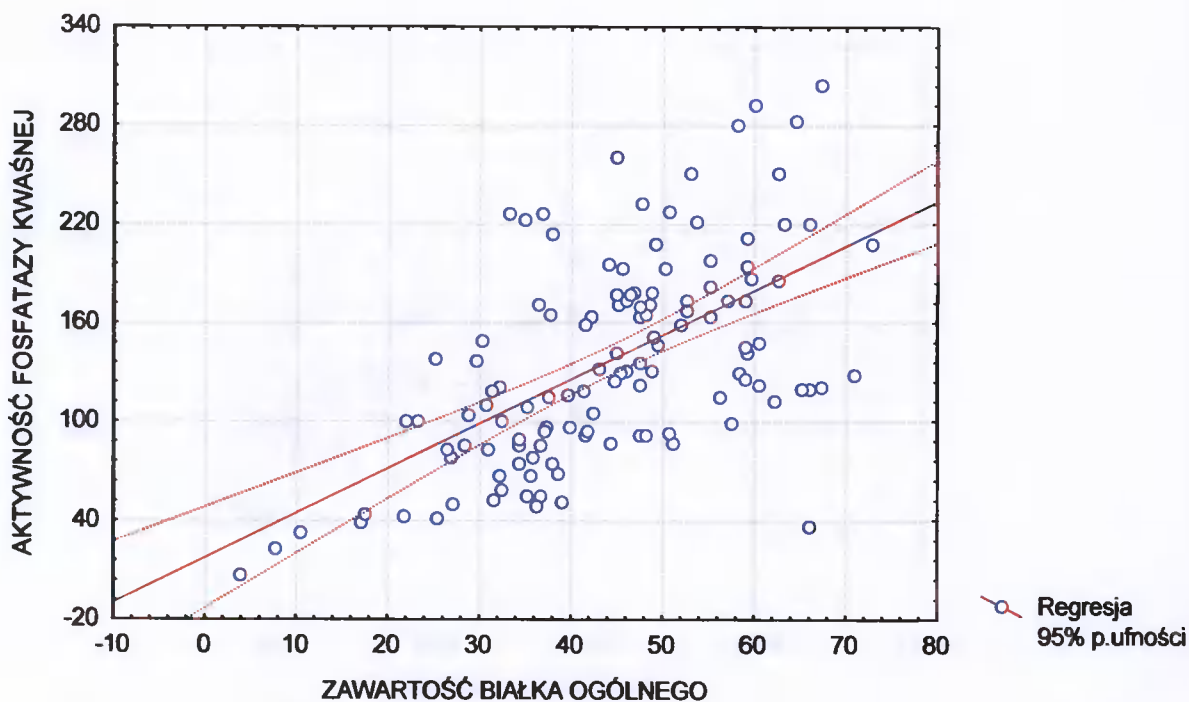
Rys. 5.8. Zależność aktywności inhibitora trypsyny od aktywności fosfatazy kwaśnej ($r=0,6507$)



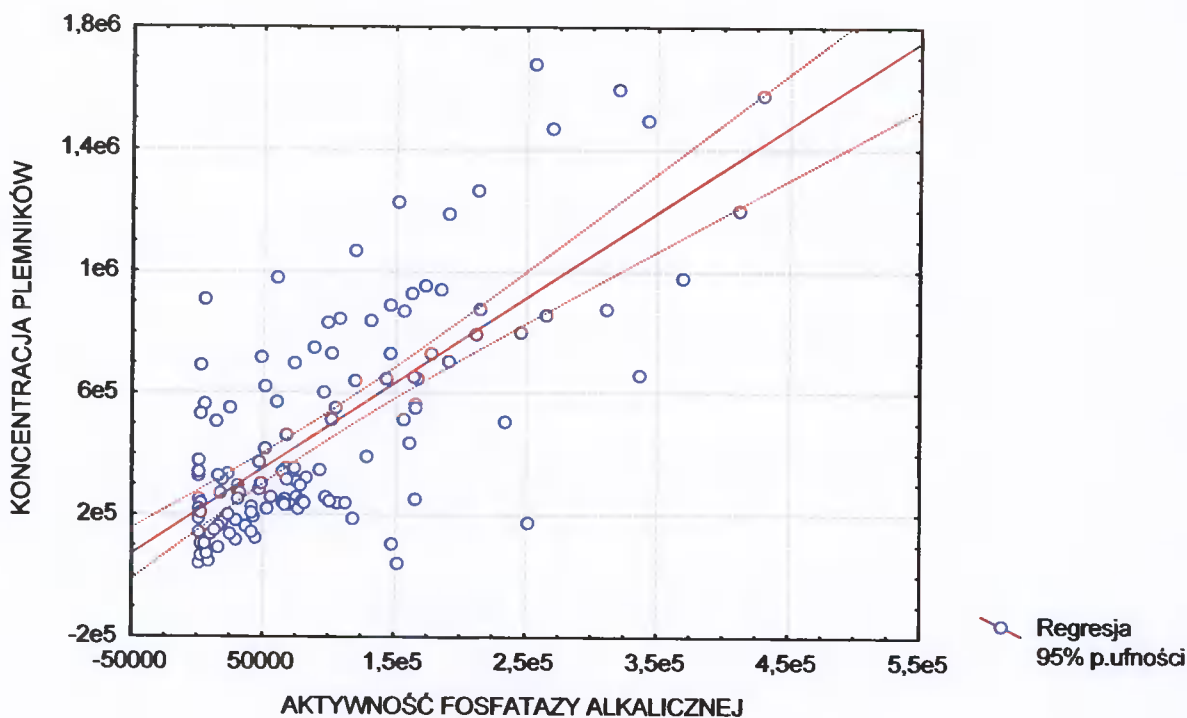
Rys. 5.9. Zależność aktywności inhibitora trypsyny od aktywności fosfatazy alkalicznej ($r=0,8100$)



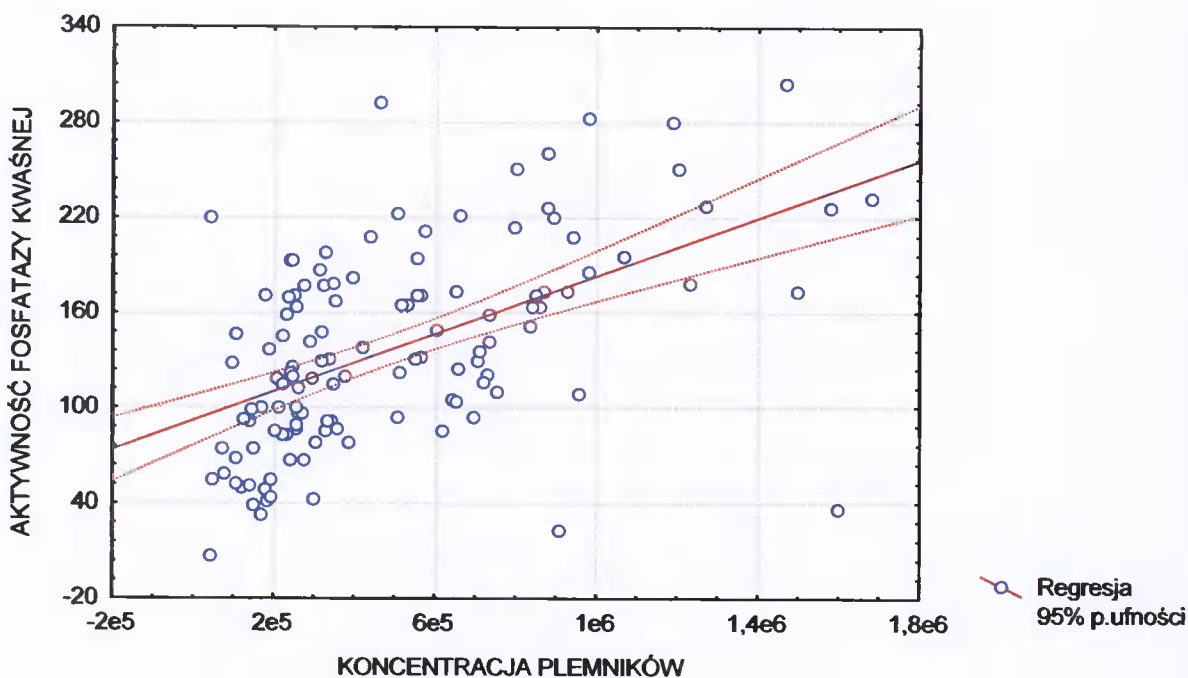
Rys. 5.10. Zależność aktywności inhibitora trypsyny od koncentracji plemników ($r=0,6516$)



Rys. 5.11. Zależność aktywności fosfatazy kwaśnej od zawartości białka ogólnego ($r=0,578$)



Rys. 5.12. Zależność koncentracji plemników od aktywności fosfatazy alkalicznej ($r= 0,6302$)



Rys. 5.13. Zależność aktywności fosfatazy kwaśnej od koncentracji plemników ($r= 0,5676$)



Biblioteka Główna UTP w Bydgoszczy

D 337

