

MAŁGORZATA DŻUGAN, ANNA BIREK

Katedra Chemii i Toksykologii Żywności,
Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski,
e-mail: mdzugan@univ.rzeszow.pl

ZMIENNOŚĆ FOSFATAZ W UKŁADZIE ROZRODCZYM SAMCÓW NIEKTÓRYCH GATUNKÓW PTAKÓW DOMOWYCH

Badano aktywność właściwą kwaśnej i zasadowej fosfatazy występującej w układzie rozrodczym samców niektórych gatunków ptaków domowych. W sezonie rozrodczym największą aktywność obu badanych enzymów stwierdzono w jądrach kaczora, mniejszą dla gąsiora i samca przepiórki japońskiej. Określono występowanie fosfataz w pozostałych odcinkach układu rozrodczego kaczora: najądrzach i nasieniowodach. Stwierdzono, że poziom aktywności badanych enzymów był wielokrotnie wyższy w jądrach niż w najądrzach i nasieniowodzie. W okresie nieprodukcyjnym obserwowano nieznaczny spadek poziomu aktywności fosfatazy kwaśnej w jądrach, najądrzach i nasieniowodach kaczora. Równocześnie w analizowanych tkankach stwierdzono istotne zwiększenie aktywności fosfatazy zasadowej. W okresie nieprodukcyjnym obserwowano większe zróżnicowanie osobnicze pod względem masy jąder i aktywności badanych enzymów.

Słowa kluczowe: ptaki, układ rozrodczy męski, fosfataza kwaśna, fosfataza zasadowa

I. WSTĘP

Fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych – to grupa hydrolaz, katalizująca odszczepianie reszty fosforanowej od białek, tłuszczów, nukleotydów i wielu innych związków. Enzymy te zostały podzielone na dwie grupy w oparciu o pH ich optymalnego działania: w środowisku zasadowym (9.0-10.0) – fosfatazy zasadowe (EC 3.1.3.1) oraz kwasowym (5.0) – fosfatazy kwasowe (EC 3.1.3.2) [2]. Fosfataza zasadowa jest obecna w tkankach i wydzielinach męskiego układu rozrodczego, a jego stężenie w nasieniu wykazuje zróżnicowanie gatunkowe. Największą aktywnością fosfatazy alkalicznej charakteryzuje się plazma nasienia knura i królika, pośrednią tryka i buhaja, a niską człowieka i ptaków [1,5,8]. Wykazano, że źródłem tego enzymu w plazmie nasienia knura jest wydzielina najądrzy [4,6] oraz stwierdzono dodatnią współzależność pomiędzy aktywnością w plazmie a koncentracją plemników w nasieniu [7].

Fosfataza kwaśna jest dominującą fosfohydrolazą w nasieniu i narządach rozrodczych człowieka, ptaków i ryb [1,2,9]. Jej głównym źródłem w plazmie nasienia człowieka jest wydzielina prostaty [2], dlatego aktywność fosfatazy kwaśnej w moczu stosowana jest w diagnostyce nowotworu tego gruczołu. W nasieniu ssaków duże znaczenie biologiczne przypisuje się fosfatazie kwaśnej zlokalizowanej w błonie plazmatycznej plemnika. Wykazano,

* *Pracę recenzował:* prof. dr hab. Juliusz Książkiewicz, Instytut Zootechniki w Balicach

że enzym ten może uczestniczyć w reakcji akrosomowej oraz aktywacji proakrosyny do akrosyny [14].

Celem pracy było określenie zmienności gatunkowej w aktywności kwaśnej i zasadowej fosfatazy, występującej w układzie rozrodczym i nasieniu wybranych samców ptaków domowych w okresie rozrodczym i nieprodukcyjnym.

II. MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły tkanki układu rozrodczego ptaków domowych: 8 kaczorów typu pekin (jądra, najądrza i nasieniowody), 6 gąsiorów rasy biała kołudzka (jądra) i 10 samców przepiórki japońskiej *Coturnix japonica* (jądra). Ptaki pochodziły z ferm hodowlanych. Tkanki pobrano bezpośrednio po uboju ptaków i przechowywano w temp. - 20°C aż do wykonania analiz. Narządy rozrodcze kaczorów pozyskano dwukrotnie: w sezonie rozrodczym w czerwcu (n=3) oraz poza sezonem w październiku (n=5). Jądra gąsiorów (n=6) i samców przepiórki japońskiej (n=10) pobrano w sezonie rozrodczym (czerwiec). Nasienie kaczorów pobrano w sezonie rozrodczym od 10 ptaków, metodą masażu grzbietowo-brzusznego (łączna objętość pobranego nasienia 1ml). Po rozwirowaniu na plazmę i plemniki, ekstrahowano przez 30 min w temp. 37°C aktywności enzymów z plemników stosując 0.5% Triton X-100.

Homogenat tkanek (1g : 4ml 0,9% NaCl) uzyskano przy pomocy mechanicznego homogenizatora szklanego. Po odwirowaniu (14000xg, 4°C) supernatant używano do dalszych oznaczeń. Aktywność fosfataz oznaczono metodą kolorymetryczną Bassey'a [11], stosując 5.5.mM 4-nitrofenylofosforan disodowy (firmy Merck) jako substrat w pH 5.0 dla fosfatazy kwaśnej i 10.5 dla fosfatazy zasadowej. Absorbancję uwolnionego p-nitrofenolu mierzono przy 400 nm. Oznaczenia wykonywano w dwóch powtórzeniach.

Jednostką aktywności enzymatycznej [U] była taka ilość enzymu, która hydrolizowała 1µmol substratu w czasie 1min w warunkach oznaczenia. Aktywność właściwą wyrażono w jednostkach U/mg białka oznaczonego metodą Lowry'ego [12]. Obliczenia statystyczne wykonano stosując program EXCEL.

III. WYNIKI

Z porównania badanych ptaków domowych wynika, że kaczor wykazywał ok. 30-krotnie większą masę jąder niż gąsior lub samiec przepiórki, dla których stwierdzono porównywalną masę jąder. Masa ciała kaczora była 3-krotnie mniejsza niż masa gąsiora i 14-krotnie wyższa niż przepiórki (tab. 1).

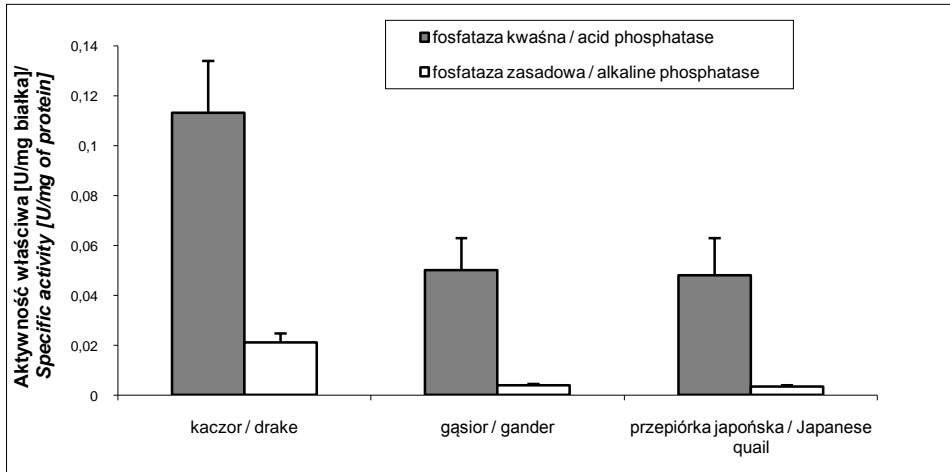
Tabela 1- Table 1

Porównanie masy ciała i masy jąder ptaków domowych (średnia±SD, współczynnik zmienności [%]) w okresie rozrodczym

The comparison of body weight and testis weight of domestic birds (means±SD, coefficient of variation [%]) during reproductive season

Samce / Males	Masa ciała / Body weight [g] (C.V. %)	Masa jąder / Testis weight [g] (C.V. %)	Udział jąder w masie ciała / Contribution of testis in body weight [%]
kaczory / drakes (n=3)	2750±150 (5%)	134,95±21,02 (16%)	4,91
przepiórki / J.quails (n=10)	195±21 (11%)	4,96±1,25 (25%)	2,54
gąsior / ganders (n=6)	8460±938 (11%)	4,93±1,46 (30%)	0,06

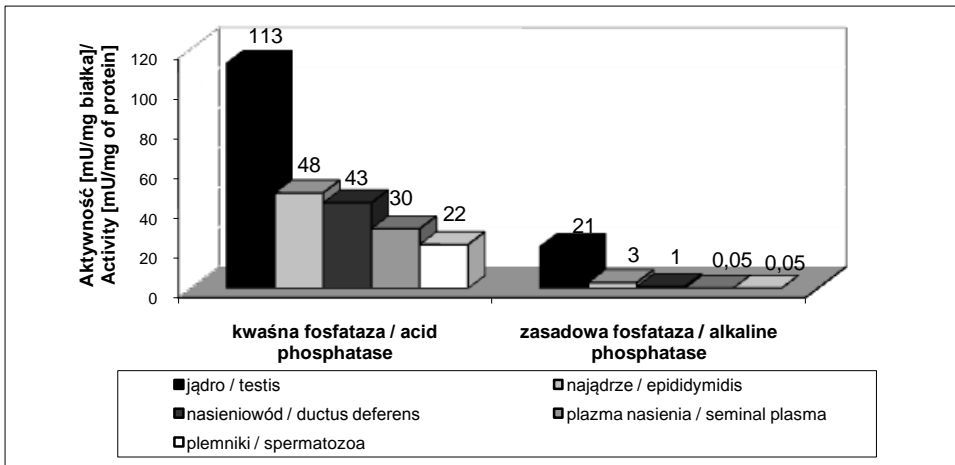
Pod względem poziomu aktywności obu fosfataz badane ptaki można uszeregować następująco: kaczor > gąsior > przepiórka (rys.1). Stosunek aktywności fosfatazy kwaśnej do zasadowej w jądrach ptaków przedstawiał się kolejno: kaczor 5:1, przepiórka 12:1 i gąsior 14:1.



Rys. 1. Aktywność właściwa [U/mg białka] kwaśnej i zasadowej fosfatazy w jądrach badanych ptaków domowych w okresie rozrodczym

Fig. 1. Specific activity [U/mg of protein] of acid and alkaline phosphatases of used domestic birds' testes during reproductive season

W układzie rozrodczym kaczora najobfitszym źródłem obu fosfataz są jądra (rys. 2). Obecność fosfatazy kwaśnej stwierdzono także w pozostałych tkankach tego układu, tj. najądrzach i nasieniowodzie (ok. 2-krotnie niższą), jak również w plazmie nasienia i plemnikach. Aktywność fosfatazy zasadowej we wszystkich badanych tkankach była znacznie mniejsza, a w nasieniu śladowa (rys.2).



Rys.2. Aktywność właściwa [mU/mg białka] fosfatazy kwaśnej i zasadowej w narządach rozrodczych i nasieniu kaczora

Fig. 2. Specific activity [mU/mg of protein] of acid and alkaline phosphatases of drake's reproductive organs and semen

Tabela 2 - Table 2

Sezonowe zmiany aktywności właściwej [U/mg białka] kwaśnej i zasadowej fosfatazy w układzie rozrodczym kaczora; podano wartość średnią \pm SD oraz współczynnik zmienności [%]; a,b-statystycznie istotne różnice ($p<0,01$)

Seasonal changes of acid and alkaline phosphatase's specific activities [U/mg of protein]; means \pm SD and coefficient of variation [%] were shown; a,b- statistically significant differences ($p<0.01$)

Tkanka / Tissue	Masa tkanki / Tissue weight [g] C.V. [%]	Aktywność właściwa fosfatazy / Specific activity of phosphatase [U/mg białka] / [U/mg of protein] C.V. [%]	
		Kwaśna / Acid	Zasadowa / Alkaline
jądro / testis			
okres rozrodczy / reproductive season (n=3)	134,95 \pm 21,02 16%	0,113 \pm 0,022 a 19%	0,021 \pm 0,004 a 18%
okres niereprodukcyjny / non-reproductive season (n=5)	4,80 \pm 5,02 105%	0,103 \pm 0,027 a 26%	0,047 \pm 0,015 b 32%
najądrze / epididymidis			
okres rozrodczy / reproductive season (n=3)	1,95 \pm 0,45 23%	0,048 \pm 0,009 a 18%	0,003 \pm 0,001 a 33%
okres niereprodukcyjny / non-reproductive season (n=5)	0,27 \pm 0,08 53%	0,027 \pm 0,010 a 37%	0,010 \pm 0,005 b 50%
nasieniowód / ductus deferens			
okres rozrodczy / reproductive season (n=3)	0,58 \pm 0,031 54%	0,043 \pm 0,013 a 30%	0,001 \pm 0,0004 a 40%
okres niereprodukcyjny / non-reproductive season (n=5)	0,12 \pm 0,08 67%	0,022 \pm 0,010 b 45%	0,004 \pm 0,0018 b 45%

W okresie nieprodukcyjnym stwierdzono gwałtowną involucję jąder kaczora (ok. 30-krotną) i najądrzy (5-krotną) (tab.2). Zmienność osobnicza pod względem masy jąder była znacznie większa w tym okresie niż w sezonie rozrodczym. Wartości współczynników zmienności w okresie involucji kształtowały się na poziomie 105% i 53% a w sezonie rozrodczym 16% i 23%, odpowiednio dla masy jąder i najądrzy.

W fazie involucji stwierdzono nieznaczny spadek aktywności fosfatazy kwaśnej w jądrach, najądrzach i nasieniowodach, ale tylko w przypadku ostatniego narządu były one istotne statystycznie (tab. 2). Aktywność fosfatazy zasadowej w tkankach w fazie regresji wzrastała istotnie statystycznie ($p<0,01$) w jądrach (ok. 2-krotnie), najądrzach (3-krotnie) oraz nasieniowodach (4-krotnie) (tab. 2).

V. DYSKUSJA

W pracy przedstawiono po raz pierwszy występowanie fosfatazy kwaśnej i zasadowej w nasieniu i tkankach układu rozrodczego kaczora. W okresie rozrodczym w układzie tym stwierdzono aktywność obydwu fosfataz, przy czym aktywność fosfatazy kwaśnej przeważała we wszystkich tkankach. Najwyższy poziom aktywności badanych enzymów stwierdzono w jądrach. W nasieniu kaczora wykazano obecność fosfatazy kwaśnej i brak (lub śladową) aktywność fosfatazy zasadowej.

Spośród badanych gatunków ptaków, kaczora charakteryzuje nie tylko największy rozmiar gonad, szacowany procentowym udziałem masy jąder w masie ciała, ale także największa aktywność właściwa obu fosfataz. Niespotykana u pozostałych gatunków ptaków wielkość gonad aktywnych kaczorów znajduje potwierdzenie w badaniach Sheng i Fang [15], którzy

wykazali że masa w pełni rozwiniętych jąder kaczorów rasy Shao stanowi około 6,6% masy ciała. Aktywność kwaśnej i alkalicznej fosfatazy z jąder była badana w cyklu rozrodczym kogutów różnych ras [3]. Średnia aktywność właściwa w jądrach badanych kogutów wynosiła 0,067 U/mg białka dla fosfatazy kwaśnej i 0,022 U/mg białka dla fosfatazy zasadowej. Stwierdzona u kaczoza aktywność fosfatazy kwaśnej była ok. 2-krotnie większa, podczas gdy dla pozostałych badanych gatunków zbliżona do opisanej u koguta [3]. Aktywność fosfatazy zasadowej w jądrach gąsiorów i przepiórek japońskich była (ok. 4-krotnie mniejsza) niż u koguta i kaczoza, gdzie stwierdzono porównywalny poziom aktywności tego enzymu [3].

U ssaków aktywność fosfataz była korelowana z wartościami parametrów jakościowych nasienia, fazą cyklu rozrodczego oraz długością stosowanego dnia świetlnego. W badaniach prowadzonych na knurach wykazano wzrost poziomu aktywności fosfatazy alkalicznej w okresie jesienno-zimowym [7]. U dzików stwierdzono istotną współzależność między aktywnością tego enzymu a długością dnia świetlnego [10]. Występowanie fazy spoczynkowej w rozrodzie kaczorów jest związane z drastyczną inwolucją gonad (ok. 30-krotna redukcja masy gonad). Jednym z nadrzędnych czynników regulujących morfologiczne i histologiczne zróżnicowanie gonad w cyklu rocznym u ptaków sezonowych jest fotoperiodyzm, chociaż jak wynika z piśmiennictwa [13], światło w najmniejszym stopniu oddziałuje na uaktywnienie komórek rozrodczych kaczoza.

Aktywność badanych fosfataz ulegała zmianom związanym z fazą cyklu rozrodczego. W czasie inwolucji stwierdzono spadek aktywności fosfatazy kwaśnej w porównaniu do sezonu reprodukcyjnego we wszystkich odcinkach układu rozrodczego, najmniej zaznaczony w jądrach. Odwrotną tendencję obserwowano dla fosfatazy zasadowej, której aktywność wzrastała w tkankach w fazie spoczynkowej, zwłaszcza w najądrzach. W jądrach kogutów wykazano, że aktywność kwaśnej i zasadowej fosfatazy nie jest skorelowana z masą jąder [3]. Odmienną tendencję stwierdzono dla kwaśnej proteinyazy, bowiem aktywność tego enzymu wykazywała ujemną współzależność z masą jąder [3]. Z powyższych przykładów wynika, że enzymy lizosomowe wykazują różne typy zależności aktywności od masy jąder, co sugeruje, że mogą one występować w różnych komórkach i/lub brać udział w różnych procesach fizjologicznych. Nie stwierdzono dużej zmienności osobniczej w poziomie aktywności badanych enzymów z jąder kaczoza w sezonie rozrodczym, gdyż zmienność ukształtowała się na poziomie <30%. Natomiast w fazie spoczynkowej obserwowano większe różnice osobnicze (współczynnik zmienności 18-50%).

VI. WNIOSKI

1. W jądrach ptaków występuje wysoka aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej, przy czym poziom aktywności jest zróżnicowany w zależności od gatunku samców.
2. W nasieniu ptaków aktywność fosfatazy kwaśnej stwierdzono zarówno w plazmie jak i plemnikach, podczas gdy aktywność fosfatazy alkalicznej w nasieniu była śladowa.
3. W układzie rozrodczym największą aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej obserwowano w jądrach, mniejszą w najądrzach i nasieniowodach.
4. U ptaków o sezonowym rozrodzie aktywność obu fosfataz ulega zmianom związanym z fazą cyklu rozrodczego.

VII. LITERATURA

1. Bell D.J., Lake P.E.: A comparison of phosphomonoesterase activities in the seminal plasmas of the domestic cock, turkey tom, boar, bull, buck, rabbit and of man. J. Reprod. Fert. 3. pp. 363-368. 1962.

2. Dziembor E.: Fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych. Post. Biochem. 16(1). s. 89-99. 1970.
3. Dżugan M., Droba B., Droba M.: Activities of acid and alkaline phosphatase and acid protenase in the testes of cocks of different breeds. Ann. Anim. Sci. 1. pp. 81-86. 2001.
4. Einarsson S., Gustafsson B., Settergren I.: Alkaline phosphatase activity of epididymal contents in boars with normal and reduced spermatogenesis. Andrologia. 8 (1). pp. 25-28. 1976.
5. Ferneley H.N.: Mammalian alkaline phosphatases. The Enzymes. 4 (18). pp. 417-447. Ed. P.D. Boyer, Academic Press. New York. 1971.
6. Glogowski J.: Fosfataza alkaliczna układu rozrodczego knura. Acta Acad. Agricult. Tech. Olszt. Zoot. 31 B. s. 1-53.
7. Glogowski J., Falkowski J., Rotkiewicz T.: Aktywność fosfatyz w plazmie nasienia knurów w cyklu rocznym i ich związek z podstawowymi wyznacznikami jakościowymi ejakulatów. Roczn. Nauk. Zoot. 24. s. 85-95. 1997.
8. Glogowski J., Strzeżek J.: Molecular forms of alkaline phosphatase of ram seminal plasma-some properties and changes in pathological process of reproductive organs. Anim. Reprod. Sci. 3. pp. 307-323. 1981.
9. Guha K., Vanha-Perttula T.: Testicular acid phosphatases in cattle, sheep, guinea pig and rabbit. Arch. Androl. 4. pp. 331-339. 1980.
10. Kozdrowski R., Dubiel A.: The effect of season of the properties of Wild boar (*Sus strofa L.*) semen. Anim. Reprod. Sci. 80. pp. 281-289. 2004.
11. Linhardt R., Walter K. Phosphatases (Phosphomonoesterases). W: Methods of enzymatic analysis, Ed. Bergmeyer H.U., Verlag Chemie GMBH Weinheim/Berdstr., Acad. Press, New York and London. pp 779-787. 1963.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Randal R.J.: Protein measurement with the phenolreagent. J. Biol. Chem. 193. pp. 265-275. 1951.
13. Potemkowska E.: Technologia przemysłowej produkcji drobiarskiej. PWRiL Warszawa. s. 421. 1983.
14. Salzberger Z., Lewin L.M., Shalagi R.: Loss of acid phosphatase from rat spermatozoa as a method for assessing acrosome reaction. Andrologia. 24. pp. 155-159. 1992.
15. Sheng Y., Fang D.: Age-related changes of the structure of testicles of the male shao duck. Proceedings, 9th Int. Symp. of Waterfowl. Pisa. Italy. pp. 82. 1992.

VARIABILITY OF PHOSPHATASES IN THE MALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF SOME DOMESTIC BIRD SPECIES

Summary

The activity of acid and alkaline phosphatases from reproductive tracts of domestic birds was studied. In the reproductive season the highest activity of both studied enzymes was found for drake's testes, followed by gander and male Japanese quail. The distribution of acid and alkaline phosphatases in other parts of the drake's reproductive system was studied. It was proved that the activity of the studied enzymes was significantly higher in testes than in epididymes and ductus deferens. In the resting phase, a slight decrease of acid phosphatase activity in all tissues studied was observed, whereas a remarkable increase of alkaline phosphatase activity in all tissues was noted. A higher individual variability in testes mass and enzyme activities in the resting phase was noted.

Key words: birds, male reproductive system, acid phosphatase, alkaline phosphatase