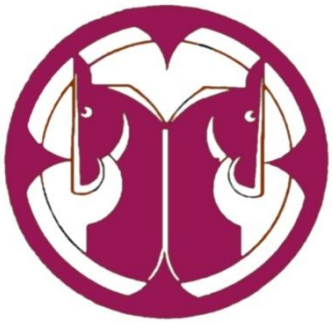
UNIWERSYTET WARMIŃSKO – MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT



mgr inż. Katarzyna Teresa Rafalska

(Nr albumu 1507)

Analiza fosfoproteomów ejakulatów indorów (*Meleagris gallopavo*) o zróżnicowanej jakości biologicznej

Praca doktorska wykonana w

Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt

pod kierunkiem

dr. hab. inż. Pawła Wysockiego prof. UWM

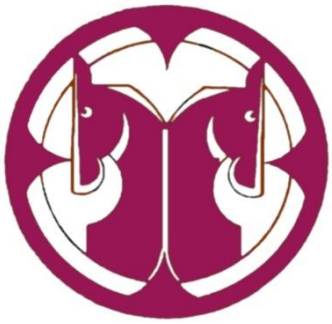
Promotor pomocniczy**:**

dr inż. Aleksandra Orzołek

Olsztyn 2023

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN

FACULTY OF ANIMAL BIOENGINEERING



mgr inż. Katarzyna Teresa Rafalska

(Student no. 1507)

Analysis of phosphoproteomes of turkey (*Meleagris gallopavo*) ejaculates with different biological quality

Doctoral dissertation performed in the

Department of Animal Biochemistry and Biotechnology

under the guidance of

dr hab. inż. Paweł Wysocki prof. UWM

Dissertation co-advisor:

dr inż. Aleksandra Orzołek

Olsztyn 2023

Podziękowania

Chciałabym podziękować mojemu Promotorowi **dr. hab. Pawłowi Wysockiemu prof. UWM** za zaufanie, poświęcony czas i możliwość realizacji pracy doktorskiej pod Jego opieką.

Serdecznie dziękuję mojej Promotor pomocniczej **dr inż. Aleksandrze Orzołek** za zrozumienie, cierpliwość, zaangażowanie, a przede wszystkim za dobre serce, wsparcie i ogromny entuzjazm podczas powstawania niniejszej pracy.

Dziękuję **wszystkim Pracownikom Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt** za wszelkie wskazówki, w szczególności metodyczne, pomoc techniczną oraz miłą atmosferę, na którą zawsze można było liczyć.

Szczególnie chcę podziękować **Moim Rodzicom i Siostrze**, bez których ta praca nigdy by nie powstała. Dziękuję za wszelką pomoc, cenne uwagi i wsparcie w trudniejszych momentach.

Spis treści

Wykaz skrótów 8

1. Wstęp i przegląd piśmiennictwa 11

1.1. Charakterystyka gatunku 11

1.2. Sztuczne unasienianie oraz przechowywanie i kriokonserwacja nasienia 12

1.3. Potencjalna sezonowość indyków w chowie i hodowli 15

1.4. Charakterystyka nasienia indorów 20

1.5. Syndrom żółtego nasienia 29

1.6. Proteomika i jej rozwój 31

2. Hipoteza badawcza i cel pracy 35

3. Materiał i metody 36

3.1. Materiał badawczy 36

3.2. Koncentracja plemników 37

3.3. Parametry ruchliwości plemników (CASA) 37

3.4. Ocena żywotności plemników 38

3.4.1. Ocena integralności błon komórkowych plemników w rejonie akrosomowym 38

3.4.2. Ocena funkcjonalności mitochondriów plemników 39

3.4.3. Ocena zmian apoptotycznych plemników 39

3.4.4. Detekcja tlenku azotu (NO) w plemnikach 40

3.5. Oznaczanie zawartości białka całkowitego metodą Bradforda (1976) 41

3.6. Oznaczanie aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych 41

3.6.1. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) 41

3.6.2. Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) 42

3.6.3. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT) 43

3.7. Oznaczanie zawartości zredukowanej formy glutationu (GSH) 43

3.8. Oznaczanie zawartości malondialdehydu (MDA) 44

3.9. Pomiar aktywności fosfataz alkalicznej (ALP) i kwaśnej (ACP) 45

3.10. Izolacja fosfoprotein z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa do jonów Fe^{3+} na złożu PHOS-Select Iron Affinity Gel 46

3.11. Analiza mas cząsteczkowych fosfoprotein plazm nasienia oraz ekstraktów plemnikowych za pomocą różnych rodzajów rozdziałów elektroforetycznych....46

3.11.1. Elektroforeza fosfoprotein nasienia w warunkach natywnych (Native-PAGE)..... 46

3.11.2. Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących z dodatkiem Tricine (Tricine-PAGE)..... 47

3.11.3. Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących z dodatkiem mocznika (Urea-PAGE) 48

3.11.4. Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) fosfoprotein nasienia. 48

3.11.5. Elektroforeza dwukierunkowa denaturująca (2D-PAGE) fosfoprotein nasienia..... 49

3.12. Elektrotransfer (Western Blotting) i immunodetekcja fosfoprotein....49

3.13. Identyfikacja fosfoprotein nasienia za pomocą spektrometrii mas Nano LC-MS/MS.....50

3.14. Identyfikacja fosfoprotein nasienia za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF.....52

3.15. Charakterystyka zidentyfikowanych fosfoprotein....53

3.16. Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych fosfoprotein....53

3.17. Analiza statystyczna....54

4. Wyniki 55

4.1. Analiza parametrów biologicznych plazm i plemników pochodzących z białego i żółtego nasienia indorów 55

4.1.1. Zawartość białka całkowitego w plazmach pozyskanych z nasienia białego i żółtego... 55

4.1.2. Parametry biochemiczne plazm nasienia białego i żółtego 55

4.1.3. Parametry biologiczne plemników nasienia białego i żółtego..... 56

4.1.4. Współczynniki korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia i plemników pochodzących z białego i żółtego nasienia 57

4.2. Analiza parametrów biologicznych plazm i plemników indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym....63

4.2.1. Zawartość białka całkowitego w plazmach nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym..... 63

4.2.2. Parametry biochemiczne plazm nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 64

4.2.3. Parametry biologiczne plemników w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 64

4.2.4. Współczynniki korelacji wybranych parametrów biochemicznych plazm i plemników w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 65

4.3. Analiza parametrów biologicznych plazm i plemników z nasienia białego i żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 71

4.3.1. Zawartość białka całkowitego w plazmach białego i żółtego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 71

4.3.2. Parametry biochemiczne plazm z białego i żółtego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 72

4.3.3. Wybrane parametry biologiczne plemników pochodzących z nasienia białego i żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 73

4.3.4. Współczynniki korelacji dla wybranych parametrów plazm nasienia i plemników pochodzących z białego i żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym.. 74

4.4. Analiza elektroforegramów fosfoprotein izolowanych z plazm nasienia białych i żółtych ejakulatów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodami Native-PAGE, Tricine-PAGE, oraz Urea-PAGE 86

4.5. Identyfikacja fosfoprotein plazm białego i żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym metodami spektrometrii mas na podstawie elektroforegramów uzyskanych metodami SDS-PAGE i 2D-PAGE 95

4.6. Analiza elektroforegramów fosfoprotein izolowanych z ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych i żółtych ejakulatów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodami Native-PAGE, Tricine-PAGE, oraz Urea-PAGE 119

4.7. Identyfikacja fosfoprotein ekstraktów plemnikowych białego i żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym metodami spektrometrii mas na podstawie elektroforegramów uzyskanych metodami SDS-PAGE i 2D-PAGE 128

4.8. Immunodetekcja fosfoprotein białych i żółtych plazm nasienia indorów podczas sezonów wiosenno-letniego i jesienno-zimowego 152

4.9. Immunodetekcja fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych i żółtych ejakulatów indorów podczas sezonów wiosenno-letniego i jesienno-zimowego 158

4.10. Charakterystyka zidentyfikowanych fosfoprotein.....164
4.11. Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych fosfoprotein.....187
4.12. Różnice występujące w obrębie fosfoproteomu nasienia indorów 211
5. Dyskusja..... 215
5.1. Wpływ rodzaju ejakulatu na parametry nasienia indora 215
5.2. Wpływ sezonu na parametry nasienia indora.....218
5.3. Znaczenie procesów fosforylacji/defosforylacji białek w fizjologii nasienia indora.....221
5.4. Rola wybranych zidentyfikowanych fosfoprotein w fizjologii nasienia indora.....226
5.5. Wpływ rodzaju ejakulatu na profil ufosforylowania białek nasienia.....232
5.6. Wpływ sezonu na profil ufosforylowania białek nasienia 241
5.7. Podsumowanie 245
6. Wnioski 246
7. Piśmiennictwo..... 248
Spis tabel 280
Spis rycin..... 287
Streszczenie..... 292
Summary..... 294

Wykaz skrótów

SDS-PAGE	Jednowymiarowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
2D-PAGE	Dwuwymiarowa elektroforeza w żelu poliakrylamidowym
ACP	Fosfataza kwaśna
AI	Sztuczne unasienianie
ALB	Albumina
ALP	Fosfataza alkaliczna
ALAT	Aminotransferaza alaninowa
APS	Nadsiarczan amonu
ART	Techniki wspomaganego rozrodu
AspAT	Aminotransferaza asparaginianowa
B	Plazma nasienia i/lub plemniki pochodzące z białego nasienia
BOF	Białka ostrej fazy
CAT	Katalaza
CoQ10	Koenzym Q10
CRISP	Rodzina białek wydzielniczych bogatych w cysteinę
DTT	Ditiotreitol, odczynnik Clelanda
ECM	Macierz zewnątrzkomórkowa
ESI	Elektrorozpylanie
FASN	Syntaza kwasów tłuszczowych
FPP	Pirofosforan fernezylu
GPx	Peroksydaza glutationowa
GR	Reduktaza glutationowa
GSH	Zredukowana forma glutationu

GSSG	Utleniona forma glutationu
HNE	4-hydroksynonenal
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
HS	Stres cieplny
HSP	Białka szoku cieplnego
Hx	Hemopeksyna
JZ	Wyodrębniony sezon jesienno-zimowy
LC-MS/MS	Chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas
LTF	Laktoferyna
MALDI	Desorpcja laserowa z udziałem matrycy
MDA	Malondialdechyd
MMP	Funkcjonalność mitochondriów
MS	Spektrometria mas
NAC	N-acetylo-L-cysteina
$NADPH^+$	Zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NEFA	Niezestryfikowane kwasy tłuszczowe
OD	Gęstość optyczna
PAMP	Wzorce molekularne związane z patogenami
PC	Fosfatydylocholina
PKA	Kinaza białkowa A
PMI	Integralność błon komórkowych
PTM	Proces modyfikacji potranslacyjnej
PUFA	Wielonienasycone kwasy tłuszczowe
RFT	Reaktywne formy tlenu

SCN	Podwzgórzowe jądra nadskrzyżowaniowe
SDS	Dodecylosiarczan sodu
Se-GPx	Peroksydaza glutationowa zależna od selenu
SER/Ser	Seryna
SOD	Dysmutaza ponadtlenkowa
SST	Kanaliki przechowujące nasienie
T_3	Trójjodotyronina
T_4	Tyroksyna
TEMED	N, N, N′, N′-tetrametyloetylenodiamina
THR/Thr	Treonina
TTR	Transtyretyna
TYR/Tyr	Tyrozyna
WL	Wyodrębniony sezon wiosenno-letni
YSS	Syndrom żółtego nasienia
Z	Plazma nasienia i/lub plemniki pochodzące z żółtego nasienia

Parametry ruchliwości plemników:

ALH	Amplituda bocznych odchyleń główki plemnika
BCF	Średnia częstotliwość bocznych odchyleń główki
LIN	Liniowość ruchu
PMOT	Odsetek plemników o ruchu postępowym
STR	Prostoliniowość
TMOT	Odsetek plemników ruchliwych
VAP	Średnia prędkość plemnika
VCL	Prędkość ruchu krzywoliniowego
VSL	Prędkość ruchu prostoliniowego

1. Wstęp i przegląd piśmiennictwa

1.1. Charakterystyka gatunku

Indyk domowy (*Meleagris gallopavo gallopavo var. domesticus*) jest ptakiem hodowlanym zaliczanym do rzędu grzebiących (*Galliformes*) z rodziny kurowatych (*Phasianidae*). Przodek indyka domowego jest jednym z pięciu podgatunków indyka północnoamerykańskiego (*Meleagris gallopavo*), który zamieszkuje naturalnie większość terenu Stanów Zjednoczonych i Meksyku **(Faruga i Jankowski 1996)**. Mimo iż od dawna znajduje się na listach Międzynarodowej Unii Ochrony Przyrody, to występuje tam jako gatunek najmniejszej troski, gdyż jego liczebność wykazuje tendencję wzrostową **(Źródło internetowe: www.iucnredlist.org)**. Drugim wyróżnianym gatunkiem jest indyk pawi (*Meleagris ocellata*), który występuje na małym obszarze wschodniego wybrzeża Meksyku, Gwatemali i Belize i obecnie jego liczebność wciąż spada **(Faruga i Jankowski 1996)**.

Indyk jest jednym z najpóźniej udomowionych zwierząt hodowlanych. Stało się to dopiero około 1 000 roku naszej ery. Ze względu na występowanie gatunku pierwsze stada indyków hodowanych przez ludzi pojawiły się na terenie Ameryki Środkowej oraz tak zwanej Mezoameryki. Gdy Hiszpanie dotarli do Ameryki gatunek ten został opisany przez Europejczyków. Pierwsze egzemplarze sprowadzono do Europy pięć lat po pierwszej podróży Kolumba przez Atlantyk. Potrzeba było jednak kolejnych 50 lat, aby indyka rozprzestrzeniono po Europie, a mięso indycze zaczęto uznawać za cenne i wyjątkowe. Do Polski ptak ten dotarł dopiero w XVII wieku **(Lasota-Moskalewska 2005)**.

Indyk dziki jest naturalnie ciemno ubarwiony. W trakcie pracy hodowlanej prowadzonej w Europie zaczęto uzyskiwać ptaki o jaśniejszym umaszczeniu piór, w tym także osobniki białe. Obecnie, w praktyce drobiarskiej, wykorzystuje się przede wszystkim indyki białe szerokopiersne. Charakterystyka użytkowa indyków opiera się na produkcji mięsa. Jaja indyków nie mają tak wszechstronnego zastosowania jak jaja kurze czy kacze. Stąd wysoka specjalizacja produkcji a zarazem mała różnorodność rodów i linii indyczych. Obecnie obowiązuje jedynie podział linii użytkowych ze względu na masę ciała osiąganą przez ptaki. Od dawna najbardziej popularne są typy ciężkie. W Polsce występują również typy średniociężkie, rzadziej średnie. Od mniejszych linii już zupełnie się odchodzi, ponieważ nie cieszą się one zainteresowaniem **(Faruga i Jankowski 1996)**.

Samce ptaków odróżniają się od innych samców kręgowców stałocieplnych. Po pierwsze ciepłota ciała ptaków oscyluje w granicach 40-41°C, a po drugie jądra usytuowane

są wewnątrz ciała, w okolicach przedniego płata nerek. Są to cechy charakterystyczne dla tej gromady **(Aire 2007)**. Dodatkowo takie warunki środowiska wpływają na przyspieszenie procesu spermatogenezy, który przebiega czterokrotnie szybciej niż u ssaków **(Howarth 1983, Jones i Lin 1993)**. Kolejną cechą właściwą dla ptaków jest brak dodatkowych gruczołów płciowych, które u innych zwierząt odpowiadają za wytwarzanie składników plazmy nasienia **(Lake 1971)**. Natomiast plazma nasienia ptaków za sprawą komórek wyścielających przewody wyprowadzające jądra, przewody najądrzy i nasieniowody jest produktem sekrecji apokrynowej **(Hess i in. 1976)**. Objętość ejakulatu jest niska i waha się od 0,02 ml u przepiórek do 1,9 ml u kaczek piżmowych, natomiast koncentracja plemników jest znacznie wyższa w porównaniu z nasieniem ssaków. W nasieniu indorów może osiągać nawet 12 mld plemników w mililitrze nasienia **(Chełmońska i Kassner 2007, Łukaszewicz 2012)**. Dokładny mechanizm dojrzewania plemników ptaków nie został dobrze poznany. Wiadomo, że zdolności do zapłodnienia oocytu plemniki nabywają w jądrach, natomiast możliwości ruchu w najądrzach **(Nixon i in. 2014, Asano i Tajima 2017)**. Drogi wyprowadzające nasienie kończą się w kloace. U ptaków z rzędu grzebiących, do których zalicza się indyki, narząd kopulacyjny składa się z dwóch brodawek nasiennych i rynienki nasiennej za pomocą której nasienie wydostaje się na zewnątrz i zostaje wprowadzone do układu rozrodczego samicy poprzez wywinięcie kloaki. Ponieważ kloaka jest wspólnym ujściem układu rozrodczego, pokarmowego i moczowego często może dochodzić do zanieczyszczenia nasienia **(Santiago-Moreno i Blesbois 2020)**.

1.2. Sztuczne unasienianie oraz przechowywanie i kriokonserwacja nasienia

W chowie i hodowli drobiu rozmnażanie odbywa się zarówno poprzez krycie naturalne jak i sztuczną inseminację. U większości gatunków nie ma konieczności wykluczania żadnej z metod. Jednak w przypadku indyków wymagane jest wykonywanie zabiegów inseminacyjnych (AI), ponieważ dymorfizm płciowy oraz rozrost mięśnia piersiowego samców jest na tyle duży, że uniemożliwia krycie naturalne. Najpowszechniejszą metodą pobierania nasienia od samców ptaków, stosowaną na fermach reprodukcyjnych, jest metoda **Burrowsa i Quinna (1937)**. Metoda ta polega na masażu grzbietu i bocznych okolic kloaki do momentu wynicowania przez samca prącia i oddania przez niego nasienia. Po pobraniu ejakulat jest natychmiast rozcieńczany w odpowiednim rozcieńczalniku, co zapobiega koagulacji nasienia a jednocześnie podtrzymuje jego

właściwości zapładniające. Bardzo często w czasie jednej procedury AI samicom aplikuje się nasienie pobrane nie od jednego samca, a mieszaninę pochodzącą od przynajmniej pięciu osobników, co poprawia skuteczność przeprowadzanego zabiegu. Samice ptaków wykształciły mechanizmy pozwalające na przechowywanie nasienia przez dłuższy czas. Ich jajowód wyposażony został w wyspecjalizowane zagłębienia nabłonka, tworzące kanaliki przechowujące nasienie (SST) **(Matsuzaki i Sasanami 2017)**. U poszczególnych gatunków ptaków czas przeżywania plemników w układzie rozrodczym samicy jest różny. Zależy on od jakości i charakterystyki nasienia samca, jak również od ilości i długości SST obecnych u samicy. Najdłuższy czas przechowywania nasienia wynosił około 70 dni, a zanotowano go u indyczek. Jest to możliwe ze względu na sześciokrotnie większą liczbę SST w porównaniu do SST występujących w jajowodzie kury, u której plemniki mogą przeżyć średnio 21 dni. Z drugiej strony w SST magazynowany jest jedynie 1% dostarczonego nasienia do układu rozrodczego samicy. Podejrzewa się, że owe kanaliki mogą tworzyć swego rodzaju filtr jakościowy plemników, zapobiegając przedostaniu się do nich plemników nieruchliwych lub uszkodzonych. Już wewnątrz SST plemniki poddawane są procesom, które spowalniają ich metabolizm i ruchliwość. Uważa się, że plemniki są w tym czasie odżywiane, aby nie dopuścić do wykorzystania całej puli energetycznej komórek w trakcie ich oczekiwania na opuszczenie obecnego miejsca położenia. Istnieje wiele teorii na temat mechanizmu uwalniania plemników z SST. Nie ma jasnych dowodów pozwalających jednoznacznie określić jakie jest podłoże tego mechanizmu. Podejrzewa się, że uwalnianie plemników z kanalików przechowujących nasienie ma podłoże mechaniczne, hormonalne i/lub neuronalne (**Bakst i in. 2010, Ito i in. 2011, Bakst i Bauchan 2015, Hemmings i in. 2015, Mendonca i in. 2019)**.

Rozród indyków jest całkowicie zależny od sztucznej inseminacji. Dodatkowo w trakcie wykonywania procedur AI wykorzystywać można jedynie nasienie świeże. W praktyce nasienie indorów może być przechowywane nie dłużej niż 6 godzin bez radykalnej utraty jakości plemników. Im starsze samce, od których pobiera się nasienie tym bardziej skraca się czas na jego wykorzystanie. Udowodniono, że wraz z wiekiem samców koncentracja i ruchliwość plemników oraz objętość ejakulatu ulegają obniżeniu **(Donoghue i Wishart 2000, Long i Kramer 2003, Douard i in. 2003, Kotłowska i in. 2005, Rosato i in. 2006)**. Nasienie pobierane od indorów szybko traci swoje właściwości, ponieważ jest bardzo wrażliwe na oddziaływanie zewnętrznych warunków fizyko-chemicznych. Ten fakt wpłynął na spowolnienie prac nad wykorzystywaniem technologii konserwacji nasienia

drobiu. Pierwsze próby zamrażania nasienia przeprowadzano na ejakulatach kogutów. Próby zakończyły się częściowym sukcesem **(Blesbois 2007, Iaffaldano i in. 2016)**. Kriokonserwacja jest istotną strategią biotechnologiczną. Wykorzystywana jest ona nie tylko w celu przyspieszenia pracy hodowlanej, ale i zachowania oraz ochrony zasobów genetycznych, zwłaszcza tych pochodzących od silnie zagrożonych gatunków. Obecnie metody kriokonserwacyjne pozostają najskuteczniejszymi sposobami przechowywania materiału genetycznego, w celu zabezpieczenia bioróżnorodności. Dlatego wciąż trwają prace nad określeniem parametrów odpowiednich do wykorzystywania tych procedur w celu stworzenia efektywnego kriobanku nasienia ptaków **(Kowalczyk i Łukaszewicz 2015, Thélie i in. 2019)**. W przypadku ptaków kriokonserwacja wykorzystywana jest niezwykle rzadko. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest brak odpowiedniego rozcieńczalnika, który utrzymałby jakość nasienia po przeprowadzeniu procedury mrożenia/rozmrożenia ejakulatu. Jak dotąd wykorzystanie nasienia świeżego dawało lepsze rezultaty. **Paventi i inni (2022)** wykazali, że parametry jakościowe kriokonserwowanych plemników, takie jak żywotność, ruchliwość i tolerancja osmotyczna, są obniżone względem świeżego nasienia o co najmniej 40%. Z kolei według **Wisharta (1985)** mogą one spaść nawet do 1,6% u kogutów. Za taki wynik po części odpowiada struktura plemników ptaków, zwłaszcza indorów, których plemniki są szczególnie wrażliwe na zmiany środowiskowe. Ponadto przyczyn małej popularności kriokonserwacji wśród drobiu można dopatrywać się w warunkach ekonomicznych. Koszty mrożenia i przechowywania nasienia w takiej formie są wysokie w porównaniu z ceną rynkową piskląt jednodniowych **(Blesbois 2007, Iaffaldano i in. 2016)**.

Poza badaniami nad kriokonserwowaniem nasienia ptaków trwają również prace nad wydłużeniem czasu jego przechowywania w stanie płynnym. Okres przydatności nasienia do sztucznego unasieniania wydłuża się utrzymując temperaturę przechowywania na poziomie 4-5ºC, co służy spowolnieniu metabolizmu plemników **(Blesbois i Brillard 2007)**. Spadek jakości ejakulatów poddanych konserwacji powodowany jest głównie przez strukturalne uszkodzenia plemników. W przypadku nasienia każdego gatunku drobiu niezbędne jest używanie odmiennych rozcieńczalników. Dostępnych jest kilka rozcieńczalników komercyjnych, można także przygotować je samodzielnie. Żaden z nich nie wpływa jednak na utrzymanie właściwości plemników przy 24 czy 48-godzinnym okresie przechowywania nasienia. Trwają prace nad wykorzystaniem związków egzogennych, które mogłyby poprawić przeżywalność plemników przechowywanych

w stanie płynnym. Jednym z takich związków jest fosfatydylocholina (PC), która wyraźnie poprawia skuteczność zapłodnienia przeciwdziałając procesowi peroksydacji lipidów plemników **(Long i Conn 2012)**. Zastosowanie znalazły także kofeina, N-acetylo-L-cysteina (NAC), katalaza (CAT), L-karnityna, koenzym Q10 (CoQ10). Wszystkie wyżej wymienione znacząco zwiększały ruchliwość plemników. NAC, CTA i CoQ10 poprawiały ruch postępowy plemników oraz ich parametry ruchu. Z kolei L-karnityna i koenzym Q10 poprawiały żywotność gamet oraz funkcjonalność ich błon plazmatycznych. Z kolei nanocząsteczki manganu oprócz poprawy wyżej wymienionych cech funkcjonalnych, zwiększały też aktywność dysmutazy ponadtlenkowej **(Partyka i in. 2015, Fattah i in. 2017, Slanina i in. 2018, Masoudi i in. 2019, Orzołek i in. 2021)**.

1.3. Potencjalna sezonowość indyków w chowie i hodowli

Dzikie indyki występują w różnych strefach klimatycznych. Można je spotkać zarówno w strefie umiarkowanej (północne i północno-wschodnie stany USA), podzwrotnikowej (południowe stany USA) oraz strefie zwrotnikowej (północna i środkowa część Meksyku). Sezon rozrodczy indyków rozpoczyna się w zależności od występowania ptaków między styczniem a marcem. Jednak niezależnie od miejsca bytowania gody odbywają się raz do roku, a indyczki składają od 4 do 20 jaj i wysiadują je przez, co najmniej, 28 dni. Na występowanie okresu godowego indyków wpływ ma przede wszystkim wydłużający się dzień świetlny. W warunkach hodowlanych stosuje się stymulację świetlną w naturalny sposób wspomagającą rozród **(Bradshaw i Holzapfel 2007)**.

Nie tylko ptaki są zwierzętami, na których okres rozrodczy wpływa ilość światła. Identyczne zależności występują również u ssaków. W strefie klimatów umiarkowanych, gdzie roczne amplitudy temperatur są wysokie, a niekorzystne warunki śmiertelne dla młodych zwierząt, ptaki i ssaki reagują podobnie na bodźce regulujące sezonowość rozrodu, jednak odbierają je w zupełnie inny sposób **(Nicholls i in. 1988)**. Ssaki odbierają sygnały świetlne przez fotoreceptory znajdujące się w siatkówce. Następnie są one przekazywane do ośrodka w podwzgórzu, podwzgórzowych jąder nadskrzyżowaniowych (SCN) – odpowiadających u ssaków między innymi za fizjologiczne rytmy biologiczne, oraz do szyszynki **(Kumar i Rani 1999)**. Jednak po chirurgicznym usunięciu szyszynki u ptaków nie dochodzi do zahamowania ich funkcji rozrodczych. Świadczyć to może o występowaniu bezpośredniej drogi biegnącej do ośrodka w podwzgórzu, niewymagającej obecności

szyszynki w tym procesie, tak jak ma to miejsce u ssaków **(Kunzel 1993)**. Długotrwała ekspozycja na bodźce świetlne stymulujące gonady prowadzi do występowania oporności i zahamowania sezonu rozrodczego, a u ptaków migrujących rozpoczęcie przygotowania się do wyruszenia w drogę do cieplejszych krajów **(Dawson i Sharp 2007)**.

Produkcja drobiarska jest jednym z najdynamiczniej rozwijających się sektorów przemysłu rolno-spożywczego, a jej nadrzędnym celem jest zapewnienie konsumentom stabilnych dostaw jaj i mięsa. Niekorzystne warunki klimatyczne mogą poważnie wpłynąć na wydajność produkcyjną i reprodukcyjną ptaków pobudzając negatywne reakcje fizjologiczne, behawioralne i immunologiczne **(Nawab i in. 2018, Rostagno 2020)**. Wysoka temperatura otoczenia, często dotyka stada drobiu hodowane w tropikalnych i subtropikalnych regionach świata. Jednak ze względu na ocieplenie klimatu wysokie temperatury zewnętrzne stały się problematyczne także w strefie klimatów umiarkowanych **(Renaudeau i in. 2012)**. Ptaki charakteryzuje wysoka ciepłota ciała wynosząca około 41-42ºC, która wynika najprawdopodobniej z wysokiego tempa metabolizmu. W celu osiągnięcia maksymalnego tempa wzrostu drób musi być utrzymywany w strefie termoneutralnej między 18 a 21ºC **(Kumari i Nath 2018)**. Ptaki są zwierzętami stałocieplnymi, mogącymi ściśle regulować temperaturę ciała w szerokim zakresie temperatur zewnętrznych. Jednak zbyt wysoka temperatura może przeciążyć mechanizmy termoregulacyjne, naruszając równowagę między ilością wytwarzanego ciepła metabolicznego a zdolnością do rozpraszania ciepła ciała do otoczenia. Taka zmiana powoduje hipertermię wyzwalając stres cieplny (HS) **(Renaudeau i in. 2012, Rostagno 2020)**.

Stres cieplny można podzielić, ze względu na szybkość i długość następujących zmian temperatury otoczenia na: ostry (27-38ºC od 1 do 24 godzin), umiarkowany (27-38ºC do 7 dni) oraz przewlekły (38-50ºC przez 7 dni lub dłużej) **(Yahav 2015, Maibam i in. 2018, Zmrhal i in. 2018)**. Postęp genetyczny warunkuje ograniczanie termotolerancji ptaków, które stają się bardziej podatne na HS w porównaniu do osobników z wolno rosnących linii hodowlanych. Czynnikami sprzyjającymi jest ekstremalnie wysokie tempo metabolizmu ptaków oraz słabo rozwinięte układy sercowo-naczyniowy i oddechowy **(Xu i in. 2018)**. Ptaki nie posiadają gruczołów potowych oraz dysponują niewielką powierzchnią ciała nieporośniętą piórami. Nie daje to wystarczającej możliwości utraty nadmiaru ciepła poprzez przewodzenie, promieniowanie czy konwekcję **(Renaudeau i in. 2012, Rostagno 2020)**. Osobniki cierpiące na hipertermię zwiększają częstotliwość oddechów, aby

zmaksymalizować utratę ciepła poprzez odparowanie wody z dróg oddechowych. W mechanizmie dyszenia główną rolę pełnią worki powietrzne. To one zwiększają powierzchnię parowania jednocześnie prowadząc do odwodnienia i zwiększonego wydychania dwutlenku węgla skutkującego z kolei hipokapnią, a ostatecznie alkalozą oddechową i zaburzeniami równowagi kwasowo-zasadowej **(Teeter i in. 1985, Beckford i in. 2020, Wasti i in. 2020)**.

Zwierzęta poddawane stresowi cieplnemu wykazują ograniczoną mobilizację lipidów **(Baumgard i Rhoads 2013)**. Kurczęta, świnie i bydło mleczne utrzymywane w zbyt wysokiej temperaturze wykazują postępującą redukcję krążących niezestryfikowanych, wolnych kwasów tłuszczowych (NEFA), co sugeruje ograniczone wykorzystanie zapasów energii z tłuszczów. Udowodniono, że brojlery kurze poddane stresowi cieplnemu odkładają więcej tłuszczu trzewnego, podskórnego i śródmięśniowego, co dodatkowo może utrudniać oddawanie nadmiaru ciepła z organizmu **(He i in. 2015, Lu i in. 2018, Lu i in. 2019)**. W przeciwieństwie do ssaków, kurczęta poddawane stresowi cieplnemu zwykle nie wykazują gwałtownego wzrostu poziomu insuliny we krwi. Dodatkowo inaczej niż u pozostałych zwierząt insulina nie ma silnego działania antylipolitycznego **(Belhadj Slimen i in. 2016)**. Kury poddane działaniu ciepła wykazują również nadekspresję białek zaangażowanych w lipogenezę *de novo* w wątrobie, wraz z gromadzeniem się wytworzonego tłuszczu w tym narządzie **(Flees i in 2017, Lu i in. 2019)**.

Stres cieplny aktywuje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza prowadząc do znacznego wzrostu stężenia krążącego we krwi kortykosteronu, który indukuje proteolizę, hamuje syntezę białek w mięśniach szkieletowych i zwiększa odkładanie się tłuszczu **(Yuan i in. 2008, Beckford i in. 2020)**. Kortykosteron wywiera efekt lipogeniczny poprzez promowanie ekspresji syntazy kwasów tłuszczowych (FASN) w hepatocytach i adipocytach. Nadmierny wzrost glikokortykoidów w surowicy krwi powoduje akumulację brunatnej i lipogenezę białej tkanki tłuszczowej oraz aktywuje szlak glukoneogenezy, co skutkuje zaburzeniami metabolizmu i wzrostem poziomu glukozy we krwi. Ponadto u ptaków stres cieplny prowokuje wzmożoną syntezę wazopresyny i hormonu adrenokortykotropowego, a w konsekwencji produkcję aldosteronu **(Basuony 2011, Infante i in. 2017)**. Drugim mechanizmem termoregulacji u zwierząt stałocieplnych jest oś pozdwzgórze-przysadka-tarczyca. Powszechnie przyjmuje się, że reakcje tarczycy na podwyższone temperatury otoczenia są mechanizmem adaptacyjnym, umożliwiającym zwierzętom obniżenie tempa metabolizmu i termoregulacji w celu przeciwdziałania

przegrzaniu **(Gonzalez-Rivas i in. 2020)**. Hormony tarczycy biorą udział w regulacji homeostazy i trawienia, odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu tempa metabolizmu ptaków w fazie wzrostu i produkcji jaj **(Melesse i in. 2011, Garasto i in. 2017)**. Kury nieśne i brojlery kurze poddawane działaniu stresu cieplnego wykazywały obniżone stężenia T_3 i T_4, co może być spowodowane zmniejszoną wielkością i aktywnością tarczycy **(Bobek i in. 1997, Yunianto i in. 1997)**.

Czynniki środowiskowe, zwłaszcza stres cieplny mają istotny wpływ na populację drobnoustrojów w jelitach drobiu, w tym na ich populację i właściwości **(Karl i in. 2018)**. HS wpływa niekorzystnie na budowę morfologiczną dwunastnicy, jelita czczego i krętego, co znajduje odzwierciedlenie między innymi w zmianie względnej masy jelit, wysokości i powierzchni kosmków jelitowych, głębokości krypt i powierzchni komórek wydzielających immunoglobuliny A **(Fouad i in. 2016)**. W warunkach stresowych zmniejsza się pobór paszy, a pobór wody ulega wzrostowi, co ma negatywny wpływ na wchłanianie składników pokarmowych wytwarzanych przez mikrobiom światła jelita. Na dodatek zwiększa się sekrecja i perystaltyka jelit, a wchłanianie związków odżywczych maleje **(Xing i in. 2019)**. Produkcja enzymów trawiennych, pod wpływem stresu cieplnego, zmniejsza się, a to niekorzystnie wpływa na błonę śluzową jelit prowadząc do stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. Populacje bakterii pożytecznych takich jak *Lactobacillus*, czy *Bifidobacterium* zostają zastąpione bakteriami szkodliwymi (z grupy coli i Clostridium), co w naturalny sposób powoduje obniżenie wchłaniania i w konsekwencji może doprowadzić do zespołu nieszczelnego jelita **(Abdelqader i Al-Fataftah 2016)**.

Układ immunologiczny jest ściśle związany z przewodem pokarmowym, a w szczególności z jelitem cienkim. W czasie stresu cieplnego może dojść do uszkodzenia błon komórkowych w wyniku zmian oksydacyjnych, co może doprowadzić do zaniku narządów limfatycznych takich jak grasica, torebka Fabrycjusza czy śledziona **(Tang i Chen 2015)**. Podczas osłabienia działania układu odpornościowego szkodliwe baterie, znajdujące się między innymi w pokarmie, mają ułatwioną drogę do rozwoju i kolonizacji jelit doprowadzając do problemów opisanych powyżej. Powodują one zmiany morfologiczne w komórkach limfatycznych jelit dodatkowo osłabiając, i tak już nadwyrężony, układ immunologiczny. Część z nich jest prezentowana komórkom odpornościowym wyzwalając ekspresję cytokin prozapalnych **(Goel 2021)**. Poza tym aktywowane są białka szoku cieplnego (HSP), co skutkuje osłabieniem procesów oddychania komórkowego, powodując zahamowanie wzrostu brojlerów. HSP są wewnątrzkomórkowymi białkami występującymi

powszechnie w organizmie, które aktywowane są przez czynniki stresowe **(Liu i in. 2014, El-Hack i in. 2018)**. HSP wykazują się funkcjami opiekuńczymi pomagając komórkom walczyć z efektami stresu cieplnego. Rozpoznają one niewłaściwie sfałdowane strukturalnie lub nieposiadające struktury przestrzennej białka i przywracają im poprawną formę lub hamują nieprawidłowe fałdowanie **(Richter i in. 2010)**. Białka HSP mogą mieć zróżnicowane masy cząsteczkowe. Ekspresję białka o masie 70 kDa (HSP70) uznaje się za wiarygodny marker zmian temperatury ciała **(Gaughan i in. 2013)**. Ostatnie badania wykazały fundamentalną rolę HSP70 w tworzeniu efektywnej bariery jelitowej w jelicie krętym drobiu, a także ich rolę cytoochronną w nabłonku jelitowym **(Liedel i in. 2011)**.

Na negatywne oddziaływanie stresu cieplnego, prowadzące do czasowej niepłodności, bardziej narażone są samce **(Bonato i in. 2014)**. HS ma różnorodne konsekwencje dla rozrodu, w tym te bezpośrednio wpływające na funkcjonowanie jąder zwierząt. Komórki Sertoliego są bardziej podatne na działanie wysokich temperatur zewnętrznych niż komórki Leydiga **(Aggarwal i Upadhayay 2013)**. Wzrost temperatury otoczenia powyżej neutralnej początkowo sprzyja wzrostowi koncentracji plemników i objętości nasienia, jednak jej długotrwałe działanie powoduje nasilenie peroksydacji lipidów w wyniku generowania RFT, co uszkadza jądra i ostatecznie ma szkodliwy wpływ na parametry nasienia **(Obidi i in 2008, Türk i in. 2016)**. Wykazano zależność pomiędzy oddziaływaniem środowiska a wydajnością reprodukcyjną. Stres cieplny wpływa na zmianę wrażliwości gonad na hormony metaboliczne poprzez zmianę sposobu sygnalizacji ich receptorów **(St-Pierre i in. 2003)**. W czasie sezonu letniego nasienie pobrane od kogutów charakteryzowało się wyższym odsetkiem zdeformowanych plemników. Wśród zaobserwowanych wyróżnić można deformacje główki, pęknięcia wstawki czy widoczne krople cytoplazmatyczne **(Obidi i in. 2008)**. Obserwowano też spadek koncentracji plemników oraz ich krótszą przeżywalność w układzie rozrodczym samic **(Ayo i in. 2011, Türk i in. 2016)**.

W miesiącach, w których średnia temperatura dzienna nie przekracza 21ºC plemniki indorów i kogutów charakteryzują się zwiększoną ruchliwością, koncentracją oraz przeżywalnością w porównaniu do miesięcy z wyższymi średnimi dobowymi temperaturami. W chłodniejszych miesiącach roku notowano także niższą zawartość białka całkowitego, cholesterolu, fosforu (P), fosfatazy alkalicznej (ALP), aminotransferazy asparaginianowej (AspAT), aminotransferazy alaninowej (ALAT) czy kwasu moczowego. Ponadto, w czasie panowania optymalnych temperatur zewnętrznych aktywność CAT

w nasieniu drobiu była znacznie wyższa, a peroksydacja lipidów ulegała zahamowaniu. Z kolei w miesiącach, w których temperatura przekraczała 30ºC wzrostowi podlegały objętość nasienia oraz ilość nieżywych i nieprawidłowych plemników. Jedynymi parametrami, które nie podlegały wahaniom wobec amplitud temperaturowych były zawartość trójglicerydów i wapnia w plazmie nasienia (**Prabakar i in. 2022**).

Wyniki badań wskazują, że indory i koguty produkują nasienie o wyższej jakości, gdy nie są poddawane działaniu stresu cieplnego. W warunkach naturalnych ze wzrostem temperatury wiąże się wydłużanie dnia świetlnego, ale część naukowców sugeruje, że wystawianie samców ptaków na zbyt długie oddziaływanie fotoperiodu może doprowadzić do obniżenia ich potencjału rozrodczego **(Floyd i Tyler 2011)**. Nie wiadomo, czy występują różnice w proteomach plazmy nasienia i plemników ptaków, które mogłyby być uwarunkowane sezonem. Jak dotąd uważano, że drób, w związku z utrzymywaniem go w zamkniętych budynkach inwentarskich, nie wykazuje cech sezonowości rozrodu. Jednak utrzymanie optymalnej temperatury nie zawsze jest możliwe, a w szczególności w miesiącach o najwyższych dobowych wartościach temperaturowych. Należy też pamiętać, że ogrzanie budynków inwentarskich jest o wiele łatwiejsze niż ich schładzanie, co często prowadzi do komplikacji w produkcji drobiarskiej.

1.4. Charakterystyka nasienia indorów

Plazma nasienia jest złożonym płynem biologicznym, który otacza, chroni i tworzy środowisko dla zawieszonych w niej plemników. U ssaków składa się głównie z wydzielin gruczołów dodatkowych, ale z powodu ich braku u ptaków, plazma składa się głównie z płynu najądrzowego. Podejrzewa się, że część jej składników przechodzi wprost z krwi. Udowodniono, że jakość ejakulatu ptaków i zdolność plemników do zapłodnienia zależy w głównej mierze od jego składu **(Chełmońska i Kassner 2007, Labas i in. 2015)**. Na ostateczną jakość nasienia wpływa zarówno żywotność wyprodukowanych plemników, jak i skład plazmy nasienia. Wahanie w ilości każdego składnika plazmy może zaważyć na metabolizmie nasienia, a tym samym wpłynąć na jego właściwości. Na skład plazmy nasienia mają wpływ między innymi żywienie oraz wiek samca **(Iaffaldano i in. 2008, Zaniboni i Cerolini 2009, Marzoni i in. 2013)**. Ponadto czynnikiem wywołującym zmiany w metabolizmie oraz przydatności technologicznej ejakulatu, może być interakcja plemników z plazmą nasienia. Skutkuje ona przebudową plazmolemy plemników

lub opłaszczeniem się na jej powierzchni substancji powodujących zmiany w prawidłowym funkcjonowaniu komórek **(Druart i de Graaf 2018, Kumar i in. 2019)**. Niektóre badania wskazują, że plazma może wywierać negatywny wpływ na plemniki. Takie zjawisko zaobserwowano podczas przechowywania nasienia indora w stanie płynnym **(Douard i in. 2005)**. Niemniej jednak coraz więcej wyników badań wskazuje na pozytywną rolę jaką pełni omawiany płyn. Składniki plazmy wpływają na funkcjonalność plemników, w tym zdolność do ich interakcji z wydzielinami żeńskiego układu rozrodczego oraz przekazywanie sygnałów komórkowych modulujących zjawiska immunologiczne w obrębie układu rozrodczego samicy **(Rodríguez-Martínez i in. 2010)**.

Nasienie ptaków zawiera niewielką ilość wolnych węglowodanów. **Van der Horst i Litjens (1969)** wykazali, że u indorów głównym węglowodanem nasienia jest inozytol (0,2 mg/ml). Inne węglowodany proste takie jak glukoza czy fruktoza występują w śladowych ilościach **(Lake i Wishart 1984)**. Profile lipidowe plemników i plazmy nasienia różnią się w znacznym stopniu. Całkowita zawartość lipidów w plemnikach jest wyższa niż w plazmie nasienia. Z jednej strony plazma nasienia charakteryzuje się niższym stężeniem fosfatydylocholiny, ale wyższym estrów cholesterolu oraz trójglicerydów **(Douard i in. 2000, Zaniboni i Cerolini 2009, Long 2014)**. Na profil lipidowy zarówno plazmy nasienia, jak i plemników wpływ ma wiek, gatunek, rasa i linia hodowlana. Najczęściej w profilu zmianom podlega zawartość trójglicerydów, estrów i wolnego cholesterolu, wolnych kwasów tłuszczowych oraz fosfolipidów. Udowodniono, że w plazmie nasienia młodych kogutów całkowite stężenie lipidów było niższe niż u starszych osobników **(Kelso i in. 1996)**. Plazma nasienia kogutów zawiera pięciokrotnie więcej lipidów niż indorów. Z drugiej strony, plazma nasienia indorów charakteryzuje się korzystniejszym składem procentowym cholesterolu i fosfolipidów w porównaniu do kogutów. Głównymi fosfolipidami plazmy nasienia koguta są fosfatydyloetanoloamina i fosfatydylocholina, natomiast indyka - sfingomielina **(Kelso i in. 1996, Cerolini i in. 1997, Douard i in. 2000)**. Prawie połowę zawartości kwasów tłuszczowych stanowią kwasy nasycone, natomiast pozostałą - nienasycone kwasy tłuszczowe. Spośród wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w nasieniu ptaków znaleźć można przede wszystkim omega-6. W głównej mierze są to kwas arachidonowy (20:4) oraz kwas dokozotetraenowy (22:4). Ponadto u indyków wykazano występowanie znacznie wyższych stężeń kwasów omega-9 w nasieniu **(Kelso i in. 1996, Cerolini i in. 1997, Blesbois i in. 1997)**.

Wolne aminokwasy to kolejna grupa związków występująca w plazmie nasienia ptaków. Jednak w tym przypadku zarówno gatunek jak i rasa wpływają na zróżnicowanie ich zawartości w nasieniu. Jedyną wspólną cechą plazm nasienia różnych gatunków jest występowanie w nich kwasu glutaminowego w znacznych ilościach **(Santiago-Moreno i in. 2019)**. Glutaminian może stanowić nawet około 90% całkowitej puli wolnych aminokwasów występujących w nasieniu **(El Jack i Lake 1969)**. Podejrzewa się, że może on funkcjonalnie zastępować jony chlorkowe (Cl^-) i pełnić rolę głównego anionu. Spośród aminokwasów w większych ilościach w plazmie nasienia kogutów można znaleźć także alaninę, serynę, walinę i glicynę. Pozostałe aminokwasy z reguły występują w śladowych ilościach, a ich zawartość uwarunkowana jest wpływem czynników niezależnych, na przykład rasą. Tryptofan jest najrzadziej występującym aminokwasem w nasieniu **(Santiago-Moreno i in. 2020)**.

W plazmie nasienia ptaków stwierdzono obecność hormonów. W doświadczeniu przeprowadzonym przez **Cecila i Baksta (1988)** wykazano, że w plazmie nasienia indorów stężenie testosteronu jest dwukrotnie niższe niż we krwi. Podobnie jest u kogutów **(Zeman i in. 1986)**. W plazmie nasienia ptaków występują także jony nieorganiczne. Najwyższe stężenie w przypadku kationów osiągają jony sodowe (Na^+) i potasowe (K^+). Jony sodowe występują w przewadze w plazmie nasienia, a potasowe w plemnikach. Głównym anionem plazmy nasienia jest jon chlorkowy (Cl^-). W mniejszych stężeniach występują jony wapniowe (Ca^{2+}), magnezowe (Mg^{2+}) i cynkowe (Zn^{2+}) **(Karaca i in. 2002, Long 2014)**. Istotną rolę w procesach rozrodu pełnią jony cynkowe. U indyków stwierdzono ich występowanie w plazmie nasienia i błonie śluzowej układu rozrodczego samic, co może wpływać na przeżywalność plemników. Cynk bierze udział w regulacji pobierania tlenu przez plemniki, co w przypadku indyków ma ogromne znaczenie. Plemniki indorów są bowiem bardzo wrażliwe na zmiany zawartości tlenu w środowisku. Ponadto, Zn bierze udział w hamowaniu aktywności akrozyny w plemnikach **(Bakst i Richards 1985)**.

Białka, znajdujące się w plazmie nasienia i stanowiące jej główny element składowy, wpływają na metabolizm plemników. Całkowita zawartość białka w plazmie nasienia jest specyficzna gatunkowo. Dla przykładu w plazmie nasienia koguta wynosi od 20 do 24 mg/ml, tymczasem u indora średnio 18 mg/ml **(Thurston i in. 1982, Amen i Al-Daraji 2011)**. Niemniej jednak, niezależnie od gatunku, białkiem plazmy nasienia ptaków występującym w najwyższym stężeniu jest albumina (ALB). Uważa się, że ALB może pobudzać ruchliwość plemników w czasie przechowywania nasienia. Przypisuje się jej także

funkcje transportowe, wiążące oraz regulujące ciśnienie osmotyczne. U ssaków albumina plazmy nasienia może oddziaływać na profil lipidowy plazmolemy plemników w czasie ich dojrzewania w najądrzach oraz podczas reakcji akrosomowej. Jest to wynik transportowania przez albuminę różnego rodzaju związków i opłaszczania ich na powierzchni błony plazmatycznej. Pomimo pozytywnej roli jaką odgrywa wspomniane białko w nasieniu ssaków, jego podwyższone stężenie w nasieniu ptaków może wpłynąć na obniżenie jego jakości **(Blesbois i Caffin 1992, Richardson i in. 1994, Marzoni i in. 2013)**. W plazmie nasienia ptaków znajduje się też transtyretyna (TTR), inaczej nazywana prealbuminą. Należy ona do tak zwanych białek ostrej fazy (BOF). TTR jest ujemnym BOF-em co oznacza, że jej ilość w organizmie w trakcie procesu zapalnego spada. We krwi ptaków transtyretyna wykazuje właściwości wiążące trójjodotyroninę (T_3) i tyroksynę (T_4). Badana przez **Marzoni i inni (2013)** prealbumina pochodząca z nasienia koguta została sklasyfikowana jako białko wiążące i transportujące. Do tej pory dowiedziono występowania transtyretyny w plazmach nasienia koguta i indora, ale wydaje się, że występuje również u pozostałych gatunków ptaków**.** Innym białkiem występującym w osoczu krwi i plazmie nasienia ptaków jest hemopeksyna (Hx), która wykazuje wysokie powinowactwo do hemu. Wiążąc hem ogranicza jego toksyczność względem tkanek wykazując działanie ochronne. Pozwala też na odzyskiwanie jonów żelaza w wątrobie. Stan zapalny nasila jej syntezę, co pozwala ją zakwalifikować do białek ostrej fazy. Obecność hemopeksyny wykazano także w nasieniu człowieka **(Słowińska i in. 2015)**. Proteiną wykazującą powinowactwo do jonów żelaza (Fe^{3+}) jest owotransferyna (konalbumina). Jej zdolności do wiązania żelaza sprawiają, że ma właściwości bakteriostatyczne. Podobne właściwości wykazuje występująca u ssaków laktoferyna (LTF). W plazmie nasienia indorów i kogutów znajduje się również występująca u innych zwierząt akrozyna, która bierze udział przede wszystkim w reakcji akrosomowej **(Atikuzzaman i in. 2017, Słowińska i in. 2017)**.

Istotną grupę białek w nasieniu ptaków stanowi rodzina białek wydzielniczych bogatych w reszty cysteiny (CRISP). Jej cechą charakterystyczną jest występowanie w ich sekwencji 16 reszt cysteinowych, które tworzą wiązania disiarczkowe. Jest to liczna grupa protein, która związana jest z funkcjonowaniem męskiego układu rozrodczego **(Guo i in. 2005)**. Większość kręgowców wykazuje ekspresję pojedynczego genu CRISP, natomiast ssaki wykazują obecność trzech genów z tej rodziny. Możemy je opisać jako paralogi, czyli geny mające wspólne pochodzenie ewolucyjne. W wydzielinie męskiego układu

rozrodczego ssaków możemy wyróżnić CRISP1, CRISP3 i CRISP4, które wytwarzane są w najądrzach i mogą opłaszczać błonę plazmatyczną plemników. Z kolei CRISP2 ulega ekspresji w jądrach i podczas spermatogenezy jest włączany w strukturę akrosomu. CRISP1 po połączeniu się z błoną plazmatyczną męskich komórek rozrodczych bierze udział w fuzji plemnika z komórką jajową. W przypadku nasienia ptaków obecność białek z rodziny CRISP stwierdzono u indorów i kogutów. Chociaż u kogutów występuje w niewielkim stężeniu, u indorów jest jednym z głównych białek ejakulatu. W plazmie nasienia indorów zidentyfikowano 17 izoform białek CRISP. Ich masy cząsteczkowe wahają się od 25 do 66 kDa, a punkt izoelektryczny od 4 do 7 **(Słowińska i in. 2017)**. W nasieniu indorów wykazano występowanie białka CRVP X2, które także należy do rodziny CRISP. Jego obecność potwierdzono w plemnikach i plazmie nasienia, gdzie najprawdopodobniej uczestniczy w procesie dojrzewania plemników. W komórkach rozrodczych CRVP X2 jest zlokalizowane na powierzchni główki oraz w proksymalnej części witki, gdzie może odpowiadać za wzmaganie ruchliwości komórek **(Słowińska i in. 2021)**. W plazmie nasienia ptaków występują także enzymy, między innymi proteinaza serynowa, glikozydazy, fosfataza kwaśna (ACP), czy fosfolipazy A_1 i A_2 **(Douard i in. 2004)**.

Kluczową rolę w ochronie układu rozrodczego przed reaktywnymi formami tlenu (RFT) pełnią enzymy antyoksydacyjne. Ich głównym zadaniem jest neutralizacja niebezpiecznych dla ustroju reaktywnych metabolitów tlenu (**Ball i in. 2001**). Szczególnie wrażliwe na stres oksydacyjny są błony plazmatyczne plemników. Pod wpływem nadmiernych ilości RFT fosfolipidy błonowe ulegają peroksydacji, co prowadzi do obniżenia jakości plemników. Oddziaływanie stresu oksydacyjnego jest szczególnie niebezpieczne podczas przechowywania i kriokonserwacji nasienia. Peroksydacja lipidów jest naturalnie występującym procesem biologicznym, zachodzącym łańcuchowo, prowadzącym do powstawania nadtlenków lipidów. Omawiane zjawisko dotyczy najczęściej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które posiadają mostki metylenowe ze szczególnie reaktywnymi atomami wodoru. Końcowymi produktami peroksydacji lipidów są między innymi aldehydy takie jak malondialdehyd (MDA) czy 4-hydroksynonenal (HNE). MDA jest związkiem organicznym będącym markerem stresu oksydacyjnego. Jest on również bardzo reaktywny i potencjalnie mutagenny. W przechowywanym przez 72 godziny nasieniu indyków zanotowano wzrost poziomu MDA przy jednoczesnym spadku poziomów cholesterolu i fosfolipidów (**Long i Kramer 2003, Zaniboni i Cerolini 2009, Izanloo i in. 2021).** Podstawowymi składowymi systemu

antyoksydacyjnego w nasieniu ptaków są dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) oraz katalaza (CAT). Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję redukcji anionorodnika ponadtlenkowego:

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

Zaliczana jest do metaloprotein. Ze względu na budowę możemy wyróżnić trzy izoformy dysmutazy ponadtlenkowej zarówno u ssaków jak i ptaków. SOD-1 jest enzymem cytoplazmatycznym o budowie homodimeru, którego każda z podjednostek ma masę 16 kDa. Nazywana jest też często CuZnSOD-1, ponieważ w centrum aktywnym zawiera miedź (Cu) i cynk (Zn). Druga izoforma w swoim miejscu aktywnym posiada mangan (Mn) i zlokalizowana jest w macierzy mitochondrialnej. Natomiast SOD-3, zwana również EC SOD, wydzielana jest zewnątrzkomórkowo, a w jej miejscu aktywnym tak jak w przypadku SOD-1 znajdują się Cu i Zn. Zarówno SOD-2 jak i SOD-3 mają budowę homotetrameryczną **(Surai i in. 2001, Surai 2016)**. Aktywność dysmutazy w nasieniu ptaków jest zależna gatunkowo. Drób wodny wykazuje znacznie niższe poziomy aktywności SOD w plazmie nasienia niż ma to miejsce u indyków. Natomiast w plazmie kogutów i indorów aktywność SOD jest znacznie niższa niż w ich plemnikach **(Froman i Thurston 1981, Surai i in. 1998a)**.

Peroksydaza glutationowa katalizuje redukcję nadtlenków ze zredukowanym glutationem:

$$2GSH + C \xrightarrow{\text{GPx}} GSSG + 2H_2O$$

Utleniona forma glutationu (GSSG) powstająca podczas wyżej przedstawionej reakcji negatywnie oddziałuje na komórkę, prowadząc do utleniania białek. Dlatego reakcja katalizowana przez GPx wymaga kolejnej reakcji, redukującej utlenioną formę glutationu, a zachodzi ona w obecności reduktazy glutationowej (GR) oraz zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego ($NADPH^+$):

$$GSSG + NADPH^+ + H^+ \xrightarrow{\text{GR}} 2GSH + NADP^+$$

Peroksydaza glutationowa składa się z czterech podjednostek, których masy zależne są od lokalizacji enzymu oraz od gatunku u jakiego występuje. Niezmienne jest to, że każda podjednostka zawiera w swojej budowie jon selenu (Se). U ludzi zidentyfikowano osiem izoform GPx, występujących w różnych tkankach. Peroksydaza podobnie jak SOD

występuje zarówno w plemnikach jak i w plazmie nasienia ptaków w gatunkowo uwarunkowanych aktywnościach. W plazmie nasienia najwyższe aktywności enzymu wykazano u indorów, a najniższe u kaczorów i gąsiorów **(Surai i in. 1998a, Partyka i in. 2012)**.

Katalaza należy do triady enzymatycznej odpowiedzialnej za ochronę układu przed szkodliwym działaniem RFT. Jest ona enzymem katalizującym rozkład nadtlenku wodoru:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

Podobnie jak GPx katalaza jest tetramerem, w którym każda podjednostka ma masę cząsteczkową około 60 kDa. Poza tym w swojej budowie posiada grupę prostetyczną - heminę, a także miejsce wiązania NADPH. Katalaza może działać dwojako. Gdy w ustroju stężenie nadtlenku wodoru jest wysokie, katalizuje reakcję przedstawioną powyżej. Natomiast przy niskich wartościach H_2O_2 CAT może wykazywać właściwości peroksydazy usuwając nadtlenek powodując jego utlenienie. Występuje zarówno w plazmie jak i w plemnikach. Aktywność katalazy zidentyfikowano w nasieniu kogutów i gąsiorów. Plazma nasienia kogutów wykazuje wyższą aktywność katalazy niż plemniki, natomiast u gąsiorów te proporcje są odwrotne. W nasieniu indorów do tej pory nie zidentyfikowano obecności CAT w plazmie nasienia i plemnikach **(Ścibor i Czeczot 2006, Partyka i in. 2012)**.

Enzymy antyoksydacyjne wspierane są w organizmie przez naturalne niskocząsteczkowe antyoksydanty takie jak witamina E, witamina C czy glutation. Witamina E występuje w znacznych ilościach w plemnikach ptaków, gdzie pełni ważną rolę ochronną. Poza tym jest istotnym stabilizatorem ich błon komórkowych. W plazmie znajduje się jej o wiele mniej. Stężenie witaminy E jest zależne od gatunku, przeważając u ptaków grzebiących. Drugim najważniejszym drobnocząsteczkowym antyoksydantem jest witamina C, czy inaczej kwas askorbinowy, który może być syntetyzowany przez ptaki, jednak zdolność ta ulega osłabieniu podczas sytuacji stresowych. Askorbinian występuje zarówno w plazmie nasienia jak i w plemnikach, a jego objętości w obydwu destynacjach są porównywalne. Obydwie wspomniane witaminy wspierają się w działaniach antyoksydacyjnych w układzie rozrodczym **(Surai i in. 1998b, Surai i in. 2000a, Min i in. 2016, Surai i in. 2019)**. Glutation sam w sobie również stanowi element układu antyoksydacyjnego choć jego rola jest marginalna. Reaguje poprzez grupę tiolową z RFT

i redukuje nadtlenek wodoru oraz wodorotlenki. Udowodniono, że u kogutów znajduje się głównie w plemnikach **(Bilodeau i in. 2001)**.

Różnorodność białek występujących w plazmie nasienia przekłada się na ilość funkcji jakie mogą pełnić. Do podstawowych funkcji białek plazmowych możemy zaliczyć ich wpływ na metabolizm, układ odpornościowy, ochronę antyoksydacyjną, regulację proteolizy, apoptozy, homeostazy ustroju oraz ochronę przeciwbakteryjną **(Marzoni i in. 2013, Labas i in. 2015, Słowińska i in. 2017, Li i in. 2020)**. Ponadto część białek występujących w plazmie znajduje się również w plemnikach. Jednoczesne występowanie tych samych białek w obu składowych nasienia może świadczyć o ciągłych interakcjach zachodzących pomiędzy plemnikami a środowiskiem, w którym się znajdują. Przykładami takich białek mogą być fosfolipazy czy lipoproteiny. Mają one za zadanie regulować metabolizm lipidów, zwłaszcza tych występujących w plemnikach. Ponadto udowodniono, że ekspresja fosfolipaz utrzymywana jest na poziomie niezbędnym do zapobiegania przedwczesnej destabilizacji błony komórkowej (**Douard i in. 2004**).

Plemniki ptaków, mimo że nie odbiegają funkcjonalnością ani elementami składowymi od innych plemników kręgowców, posiadają swoje charakterystyczne cechy. W odróżnieniu od ssaków główka plemnika ptaków, w szczególności z rzędu *Galliformes*, jest silnie wydłużona a pole jej przekroju poprzecznego jest niewiele większe od pola witki. Z tego powodu plemniki ptaków są dłuższe od większości plemników innych zwierząt **(Łukaszewicz 2012, Santiago-Moreno i in. 2016)**. Plazmolemma plemników ptaków w porównaniu do ssaków zawiera więcej PUFA, posiada niższy stosunek cholesterolu do fosfolipidów i większą ogólną płynność. Natomiast całkowita zawartość białka w plazmolemie plemników ptaków jest niższa. Ponadto nie wykazano, że plemniki ptaków podlegają kapacytacji w trakcie wędrówki do komórki jajowej, co jest niezbędnym etapem zapłodnienia u ssaków **(Howarth 1983)**. U ptaków, podobnie jak u gadów, występuje fizjologiczna polispermia pozwalająca na wniknięcie do oocytu kilku plemników.

Plemniki powstają w procesie spermatogenezy, która jest szeregiem złożonych procesów molekularnych związanych z podziałami mitotycznymi i mejotycznymi. Przebiega w jądrach, skąd gamety transportowane są do najądrzy, gdzie zachodzą procesy dojrzewania. Cały proces powstawania i dojrzewania męskich komórek rozrodczych jest regulowany przez wiele związków o różnym charakterze. Proces spermatogenezy u ptaków trwa średnio 13 dni, a u ssaków - 38 dni. Jednak czas przeżycia plemników ssaków

w nasieniowodach jest znacznie krótszy (około tygodnia) niż plemników ptaków (ponad półtora miesiąca) **(Jones 1998, Pardyak i in. 2018, Słowińska i in. 2020)**.

W przypadku plemników indorów głównym energetycznym szlakiem metabolicznym jest oddychanie tlenowe. W odróżnieniu od gamet kogutów nie są one aktywne w warunkach beztlenowych. Nasienie indorów jest bardzo wrażliwe na zmiany temperatury oraz poziomu tlenu w środowisku **(Sexton 1974, Long 2006)**. Molekularne podstawy mechanizmu wytwarzania i dojrzewania plemników w układzie rozrodczym indorów są słabo poznane.

W skład plazmolemy plemników indorów wchodzą głównie fosfolipidy i cholesterol, przy czym udział tych pierwszych to nawet 80% **(Cerolini i in. 1997, Zaniboni i Cerolini 2009)**. Plemniki ptaków charakteryzują się występowaniem długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które odpowiadają za wyższą płynność błony komórkowej, kinetykę ruchu plemników i metabolizm lipidów. Ilość PUFA w plemnikach jest zależna gatunkowo. U indorów w przewadze występują te, których ostatnie wiązania podwójne znajdują się w łańcuchu przy szóstym i/lub dziewiątym atomie węgla od końca **(Cerolini i in. 1997, Surai i in. 2000b)**. Reakcje utleniania w błonie komórkowej plemników prowadzą do zwiększenia ilości RFT, jak również zmian w płynności błony, utraty integralności błony komórkowej czy zaburzenia gradientów stężeń jonów **(Halliwell i Chirico 1993, Partyka i in. 2012)**.

Węglowodany pełnią w plemnikach funkcję budulcową i energetyczną. Reszty cukrowcowe biorą udział w budowie błony komórkowej, uczestnicząc w tworzeniu glikokaliksu, który w plemnikach ptaków składa się z tych samych węglowodanów co u ssaków. Węglowodany pełnią rolę energetyczną, umożliwiając plemnikom ruch **(Peláez i Long 2007)**. Jak podają **Iaffaldano i inni (2018)** poziom glukozy w plemnikach jest wyższy niż w plazmie nasienia indorów. Ponadto stężenie inozytolu jest około trzy razy niższe od stężenia glukozy w gametach indorów.

Istotnymi składnikami plemników są również aminokwasy i białka. Proteiny w plemnikach mogą pełnić funkcje enzymatyczne, regulatorowe, budulcowe, transportowe oraz wiele innych. Z kolei niektóre aminokwasy biorą udział w szlakach regulujących ruchliwość, reakcję akrosomową czy kapacytację. Obecność alaniny wpływa na ruchliwość i żywotność plemników ogiera, jednak nie potwierdzono występowania takiej zależności u ptaków **(Koskinen i in. 1989)**. W nasieniu indorów aminokwasami występującymi

w najwyższym stężeniu są kwas glutaminowy oraz glicyna. Z kolei zawartość izoleucyny, fenyloalaniny, waliny czy tyrozyny jest stosunkowo niska. W przypadku kwasu asparaginowego stężenie w nasieniu wzrasta wraz z wiekiem zwierząt i wiąże się z pogorszeniem właściwości ejakulatu **(Iaffaldano i in. 2018)**. W plemnikach mogą występować także L-karnityna, mleczan oraz kreatyna. Wzrost zawartości wszystkich tych związków wskazuje na upośledzony metabolizm mitochondriów plemników. L-karnityna bierze udział w spermatogenezie i dojrzewaniu plemników, a wewnątrzkomórkowo w β-oksydacji. Nasienie ptaków przechowywane z dodatkiem L-karnityny zachowywało zdolność zapładniającą **(Zhai i in. 2007, Tabatabaei i Aghaei 2012)**. Mleczan bierze udział w metabolizmie energetycznym zachodzącym w plemnikach. Przy postępującej niewydolności mitochondriów, jego poziom w komórce wzrasta, a ilość energii wymagana do utrzymania ruchów witki spada, prowadząc do całkowitego zatrzymania ruchliwości plemników **(Paventi i in. 2015)**.

W plemnikach wykazano też obecność enzymów antyoksydacyjnych. Aktywność SOD w plemnikach jest z reguły wyższa niż w plazmie, ale jest to uwarunkowane gatunkowo. Aktywność dysmutazy w plemnikach indorów jest niższa w porównaniu do aktywności enzymu w gametach kogutów, kaczorów, gąsiorów i samców przepiórek **(Hess i in. 1976)**. Co więcej, także aktywność peroksydazy glutationowej w plemnikach indorów jest niższa niż u pozostałych gatunków drobiu. W badaniach udowodniono, że u wszystkich wyżej wymienionych gatunków główną formą GPx jest ta zależna od selenu (Se-GPx). W plemnikach indorów występuje mniej peroksydazy niż w plazmie nasienia **(Surai i in. 1998a)**. Naturalne antyoksydanty również biorą aktywny udział w ochronie komórek rozrodczych ptaków. Witamina E, występując głównie w plemnikach, stabilizuje plazmolemę. Z kolei witamina C jest obecna zarówno w plazmie nasienia, jak i w komórkach rozrodczych **(Surai i in. 2000b, Surai i in. 2019)**.

1.5. Syndrom żółtego nasienia

Syndrom żółtego nasienia (YSS) jest jednym z głównych problemów występujących wśród indorów użytkowanych rozrodczo. Szacuje się, że 10-16% indorów na fermach rozrodowych dotkniętych jest tym schorzeniem **(Sexton 1976, Thurston i in. 1992, Słowińska i in. 2015)**. Cechą charakterystyczną nasienia z YSS jest jego żółta barwa, podczas gdy prawidłowe nasienie charakteryzuje się białą barwą. Zmienionej barwie

towarzyszą niższe parametry ilościowe i jakościowe ejakulatów w konsekwencji prowadzące do obniżenia skuteczności zapłodnienia i wylęgu **(Thurston i in. 1982, Hess i Thurston 1984, Thurston i in. 1992, Thurston i Korn 1997)**. W przypadku syndromu YSS objętość ejakulatu oraz koncentracja plemników nie ulegają zmianie, jednak zwiększeniu ulega liczba nieprawidłowych plemników, spermatyd oraz drobnoustrojów. Etiologia syndromu żółtego nasienia nie została dostatecznie poznana, choć prace trwają już od ponad czterdziestu lat. Jako najbardziej prawdopodobne przyczyny występowania YSS podaje się uwarunkowania genetyczne, suboptymalne fotoperiody oraz chów wsobny będący efektem prac hodowlanych prowadzonych w celu ulepszenia genotypu indyków **(Thurston i Korn 1997)**.

W dotychczasowych badaniach na temat różnic w składzie białego i żółtego nasienia najczęściej pojawiającym się spostrzeżeniem jest fakt, iż parametrem wskazującym na obecność YSS u danego osobnika jest znacznie podwyższony poziom białka całkowitego w plazmie nasienia **(Thurston i in. 1982, Hess i Thurston 1984)**. U osobników oddających nasienie białe zawartość białka nie przekracza 10 mg/ml, podczas gdy w plazmie nasienia indorów z YSS wynosi ponad 20 mg/ml. Nasienie żółte charakteryzuje się też podwyższoną aktywnością aminotransferazy asparaginianowej, fosfatazy kwaśnej i dysmutazy ponadtlenkowej **(Hess i in. 1982)**. Z drugiej strony wskazano, że wyniki te mogą być błędne, ponieważ wzrost aktywności wspomnianych enzymów nie był proporcjonalny do wzrostu zawartości białka całkowitego i w rzeczywistości poziomy aktywności wyżej wymienionych enzymów były niższe niż w nasieniu białym **(Słowińska i in. 2015)**. Zawartość cholesterolu, albuminy, transtyretyny, hemopeksyny, immunoglobulin i/lub białka podobnego do proteinazy mogą stać się potencjalnymi markerami białkowymi syndromu YSS. Wszystkie wyżej wymienione wskaźniki ulegają podwyższeniu w nasieniu z YSS. Podejrzewa się, że za żółtą barwę nasienia może odpowiadać podwyższony poziom ryboflawiny i/lub albuminy w plazmie **(White i Lincoln 1960, Słowińska i in. 2015)**. Białkiem najbardziej różnicującym nasienie białe od żółtego jest albumina (ALB), która jednocześnie jest jednym z dominujących w plazmie nasienia **(Słowińska i in. 2017)**. Transkrypty mRNA albuminy zlokalizowano zarówno w układzie rozrodczym jak i w wątrobie indyków. Sekrecja w nasieniowodach ptaków z syndromem żółtego nasienia jest ponad 50-krotnie wyższa niż u indorów oddających białe nasienie. Natomiast zarówno w jądrach, najądrzach jak i w wątrobie synteza ALB u ptaków dających białe i żółte nasienie nie różniła się znacząco **(Słowińska i in. 2019)**.

Na podstawie badań metabolomicznych stwierdzono, iż kolejnym czynnikiem odróżniającym nasienie żółte od białego jest metabolizm lipidów, a proces syntezy i degradacji lipidów jest zmieniony w YSS. Produkty pośrednie biosyntezy kwasów tłuszczowych i steroidów takie jak malonylo-CoA i pirofosforan fernezylu (FPP) występują w podwyższonych ilościach w plazmie nasienia YSS. Nadmierne ilości malonylo-CoA i ryboflawiny mogą powodować zwiększoną peroksydację lipidów, co może skutkować obniżoną jakością nasienia **(Słowińska i in. 2018)**. Dodatkowo zaobserwowano nieprawidłowości nabłonka nasieniowodów indorów dotkniętych YSS, w postaci przerostów komórkami zawierającymi liczne wakuole lipidowe **(Hess i in. 1982, Thurston i Korn 1997)**. Wykazano też związek pomiędzy występowaniem syndromu żółtego nasienia, a zaburzeniami w metabolizmie hormonów tarczycy. W nasieniu YSS odnotowano wzrost poziomu wspomnianej wcześniej TTR, natomiast monojodotyrozyna – związek pośredni w przemianach hormonów tarczycy, był obecny w niższych ilościach **(Słowińska i in. 2018)**.

1.6. Proteomika i jej rozwój

Proteomika zajmuje się oznaczaniem ilościowym i jakościowym proteomu, czyli kompletu białek występujących w komórce, tkance, narządzie lub organizmie w danym momencie funkcjonowania. Terminu „proteomika” użyto po raz pierwszy niespełna trzydzieści lat temu, a sama nazwa powstała poprzez analogię do istniejącej już genomiki, która zajmuje się opisywaniem i poznawaniem materiału genetycznego. Proteomika jest jednak zagadnieniem o wiele szerszym niż genomika. Genomika skupia się na genomie, który zazwyczaj nie podlega zmianom w trakcie życia komórki, natomiast proteom ulega ciągłym modyfikacjom. Ponadto białka nabywają struktur przestrzennych, które niezbędne są do ich poprawnego działania. Techniki i analizy proteomiczne są znacznie bardziej skomplikowane, lecz przynoszą również jednorazowo wiele bardzo dokładnych danych na temat badanego materiału **(Płodzich 2013)**.

Białka pełnią w organizmach żywych różnorodne role. Często jedno białko spełnia więcej niż jedną funkcję i jest to uwarunkowane miejscem jego występowania, zawartością czy warunkami fizyko-chemicznymi. Białka w natywnej formie wpływają na regulację procesów metabolicznych. Taką możliwość zachowują także po przejściu modyfikacji potranslacyjnych katalizowanych przez specyficzne enzymy, które notabene też są białkami.

Modyfikacje potranslacyjne to przede wszystkim reakcje sulfatacji, hydroksylacji, glikozylacji, fosforylacji czy ubikwitynacji. Każda z nich ma za zadanie zmienić strukturę białka tak, aby zmienić jego funkcję lub je wyłączyć z pełnienia swoich funkcji. Część z omawianych modyfikacji jest odwracalna **(Płodzich 2013)**.

Dzięki możliwościom jakie dają nam narzędzia proteomiczne możliwe jest dokładniejsze przedstawienie zmian zachodzących na poziomie komórek. Nie obywa się to jednak bez problemów, które mogą wpłynąć na uzyskanie pełnej analizy proteomu. Często ilość informacji możliwych do zebrania w trakcie doświadczenia może przerastać zdolność bioinformatycznej analizy danych. Przeszkodą jest również różnorodność białek, ich złożoność, jak również zmienność ich zawartości w jednostce czasu. W odróżnieniu od genomu, proteom jest bardzo dynamiczny i podlega zmianom zarówno pod wpływem środowiska jak i czasu (**Hirsch i in. 2004**).

Rozdział zawiesiny białka najczęściej przeprowadza się przy użyciu metod elektroforetycznych lub chromatograficznych. Do tej pory najczęściej wykorzystywanymi metodami elektroforetycznymi są elektroforeza jednokierunkowa (SDS-PAGE) i dwukierunkowa (2D-PAGE) w żelach poliakrylamidowych. Jednokierunkowa elektroforeza pozwala na rozdział białek ze względu na ich masę cząsteczkową. Natomiast 2D-PAGE składa się z dwóch etapów, przy czym pierwszy z nich polega na rozdziale białek ze względu na ich punkt izoelektryczny, a drugi ze względu na ich masę cząsteczkową. W rezultacie elektroforeza 2D-PAGE daje mapę proteomiczną przedstawiającą pojedyncze białka w formie tak zwanych „spotów", które po wycięciu można poddać identyfikacji (**Liumbruno 2008**). Oprócz wyżej wymienionych szeroko stosowana jest także elektroforeza natywna, przeprowadzana bez udziału dodecylosiarczanu sodu (SDS), jak również wiele modyfikacji tejże metody. Zupełnie inną metodą rozdziału białek jest wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). W tym przypadku elementem rozdzielającym białka jest złoże osadzone w kolumnie chromatograficznej a przepłukiwanie go odpowiednimi roztworami pozwala na rozdzielanie i wypłukiwanie z niego kolejnych frakcji białek **(Mitulovic i Mechtler 2006)**.

Metodą pozwalającą na identyfikację białek i wykorzystywaną obecnie najczęściej jest spektrometria mas (MS). Metoda ta opiera się na pomiarze stosunku masy do ładunku elektrycznego badanego jonu. Wyniki uzyskiwane podczas analizy przedstawiane są w postaci widma masowego. Wyróżnia się wiele rodzajów spektrometrii mas, które różnią

się przede wszystkim konstrukcją wykorzystywanego urządzenia. Niezależnie jednak od konfiguracji urządzenia, w każdym spektrometrze masowym wyróżnia się trzy podstawowe elementy. Pierwszym z nich jest jonizator, którego zadaniem jest jonizacja cząsteczek. Proces ten może być przeprowadzany za pomocą rozmaitych technik, o różnych siłach działania. Drugim jest analizator, w którym powstałe jony podlegają segregacji na podstawie stosunku masy do ładunku elektrycznego. Trzecim z kolei elementem jest detektor, wykrywający i identyfikujący jony przedostające się z analizatora. Dane uzyskane podczas analizy MS są następnie „obrabiane" w odpowiednim programie komputerowym z wykorzystaniem dostępu do odpowiednich baz proteomicznych (**Liumbruno 2008**). W badaniach najczęściej zastosowanie znajduje metoda jonizacji za pomocą desorpcji laserowej z udziałem matrycy (MALDI). W tym przypadku podczas procesu jonizacji siła wiązki laserowej jest dostosowywana tak, aby badane cząstki się nie rozpadały, a jedynie były wybijane z matrycy. Inną metodą, równie często wykorzystywaną, jest elektrorozpylanie (ESI). Cała procedura opiera się na zastosowaniu pola elektrycznego z przyłożonym wysokim napięciem, w którym za pomocą igły rozpyla się ciecz zawierającą badany materiał. Często ze względu na złożoność badanych substancji w spektrometrach montuje się wielokrotną ilość podstawowych elementów, na przykład analizatorów jonów, co w znaczny sposób usprawnia pracę urządzenia. Co więcej, występują też maszyny łączące pracę spektrometru oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (LC-MS) (**Hirsch i in. 2004, Han i in. 2008**). Spektrometria mas stała się powszechną procedurą badawczą, ponieważ jest w stanie dostarczyć bardzo dokładnych danych na temat wartości mas cząsteczkowych poszczególnych białek i uzyskanych peptydów. Ostatecznie uzyskane informacje analizuje się na podstawie baz danych dostępnych w internecie. Bazy są na bieżąco aktualizowane o nowe odkrycia (**Liumbruno 2008**).

Fosfoproteomika, która jest poddziedziną proteomiki, identyfikuje, kataloguje i charakteryzuje ufosforylowane białka. Fosforylacja jest zaliczana do modyfikacji potranslacyjnych które regulują funkcje białek i ich właściwości. Szacuje się, że nawet 30-65% wszystkich białek w komórce może ulegać reakcjom fosforylacji, przy czym część z tych białek niejednokrotnie (**Cohen 2002**). Reakcje ufosforylowania katalizują enzymy z grupy kinaz, należące do klasy transferaz, prowadzące najczęściej do zmiany konformacji białka i zmieniające jego właściwości. Enzymy te przyłączają grupę fosforanową zwykle do jednej z trzech reszt aminokwasowych. Są to seryna, treonina i tyrozyna. Same kinazy można podzielić ze względu na to na jakie reszty aminokwasowe podlegają ufosforylowaniu

pod wpływem ich działania. Generalnie, możemy wyróżnić kinazy serynowo-treoninowe i tyrozynowe. Chociaż występują również takie, które można zaliczyć do obydwu wyżej wymienionych grup. W komórce występują też enzymy katalizujące przeprowadzenie procesu odwrotnego, czyli defosforylacji. Proces defosforylacji katalizowany jest przez enzymy z grupy fosfataz. Fosfatazy należą do klasy hydrolaz. W zależności od pH środowiska w jakim wykazują najwyższą aktywność można je podzielić na fosfatazy kwaśne (ACP) i alkaliczne (ALP). Obecność i aktywność kinaz oraz fosfataz pozwala pozostać komórkom w stanie homeostazy. Regulują one bowiem metabolizm komórek poprzez aktywację i dezaktywację części enzymów **(Manning i in. 2002)**. Procesy fosforylacyjne i defosforylacyjne zachodzą w sposób dynamiczny.

Ilość fosfoprotein znajdujących się w danej chwili w badanej komórce jest niewielka. Co więcej modyfikacje potranslacyjne białek nie są zakodowane w genomie. Dlatego określenie miejsc fosforylacji nie jest możliwe na podstawie sekwencjonowania genomów. Mimo, że fosforylacja jest jedną z najlepiej opisanych modyfikacji potranslacyjnych, to identyfikacja fosfoproteomu nasienia wybranych gatunków zwierząt nadal napotyka na ograniczenia choćby natury technicznej. Analizy wykonywane przy pomocy przeciwciał, często wykrywają nie tylko białka ufosforylowane, lecz również takie, które mimo braku przyłączonych reszt fosforanowych w silny sposób połączone są z białkami ufosforylowanymi. Z kolei niektóre fosfoproteiny mogą zostać pominięte. W chwili obecnej nie ma metody, która dawałaby całkowitą pewność wyizolowania i identyfikacji wszystkich możliwych fosfoprotein z badanej próby. Szacuje się, że ilość analizowanych fosfoprotein to około 70-95% z wszystkich występujących, ale tylko 40-60% z wszystkich miejsc fosforylacji może być zbadana za pomocą dostępnych obecnie technik analitycznych (**Vlastaridis i in. 2017**). Fosfoproteom nasienia ptaków nie został jeszcze dostatecznie poznany, choć wykazano już wpływ zachodzących reakcji fosforylacji/defosforylacji na ruchliwość witki plemnika oraz aktywność odpowiedzialnych za te reakcje kinaz **(Asano i Tajima 2017, Słowińska i in. 2020)**.

2. Hipoteza badawcza i cel pracy

Hipotezy badawcze:

1) Istnieją różnice w składzie fosfoproteomów plazm nasienia i plemników indorów (*Meleagris gallopavo*) pochodzących z ejakulatów prawidłowych i z syndromem żółtego nasienia (YSS),
2) Sezon może mieć wpływ na fosfoproteom plazm nasienia i plemników indorów,
3) Profil ufosforylowania białek nasienia indorów może zależeć od wybranych parametrów ilościowych i jakościowych ejakulatów,

Cel pracy:

Celem pracy była analiza fosfoproteomów plazm nasienia i plemników pochodzących z ejakulatów prawidłowych i z syndromem żółtego nasienia (YSS) podczas dwóch wyodrębnionych sezonów tj. wiosenno-letniego i jesienno-zimowego, którą poprzedzono dokładną analizą ilościową i jakościową ejakulatów.

3. Materiał i metody

3.1. Materiał badawczy

Materiał doświadczalny stanowiło 100 ejakulatów indorów (*Meleagris gallopavo*) linii BIG-6 (Aviagen, Huntsville, AL, USA) pobranych od ptaków pomiędzy 39 a 42 tygodniem życia. Połowę z nich stanowiło nasienie sklasyfikowane jako białe (próby 1B-25B w sezonie wiosenno-letnim oraz próby 26B-50B w jesienno-zimowym) a kolejną ejakulaty od indorów z syndromem żółtego nasienia (próby 1Z-25Z w sezonie wiosenno-letnim oraz 26Z-50Z w jesienno-zimowym). Osobniki pochodziły z fermy rodzicielskiej firmy GERCZAK (Nord-Pol Hatchery) zlokalizowanej w miejscowości Kozia Góra na terenie województwa warmińsko-mazurskiego. Zwierzęta utrzymywane były w najwyższych standardach zoohigienicznych i bioasekuracyjnych. Materiał badawczy był pobierany przez pracowników fermy przy wykorzystaniu metody **Burrowsa i Quinna (1937)**. Nasienie pobrane od każdego osobnika było umieszczane w osobnej strzykawce, następnie oceniane na podstawie barwy i klasyfikowane jako białe lub żółte. W dalszej kolejności ejakulaty rozrzedzano za pomocą komercyjnego rozcieńczalnika Extendyl (v/v 1:1) (IMV Technologies, L'Aigle, Francja), umieszczano w termoboksie o temperaturze 38-39ºC i przewożono do Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt WBZ UWM w Olsztynie. Na miejscu przystępowano do przeprowadzania analiz.

Materiał biologiczny pobierano łącznie dziesięć razy. Za każdym razem uzyskując po pięć prób zakwalifikowanych jako nasienie białe lub żółte. Pobrań dokonywano w kwietniu, maju i czerwcu (sezon wiosenno-letni), oraz w listopadzie, grudniu i styczniu (sezon jesienno-zimowy).

Materiał badawczy podzielono na grupy ze względu na różne przyjęte kryteria. Zmiennymi były:

a. Składowa ejakulatu tj. plazma nasienia lub plemniki,
b. Rodzaj nasienia tj. nasienie prawidłowe (białe) vs. nasienie nieprawidłowe YSS (żółte),
c. Sezon, w którym nasienie zostało pobrane tj. sezon wiosenno-letni (WL) obejmujący miesiące od kwietnia do września lub sezon jesienno-zimowy (JZ) od października do marca (podział zastosowany na podstawie występowania pór roku w klimacie umiarkowanym),

Po określeniu koncentracji, ruchliwości, oceny parametrów ruchliwości i przeżywalności plemników próby wirowano przy 10 000 x g przez 10 minut. Uzyskaną plazmę przenoszono do probówek, a plemniki przemywano dwukrotnie 0,85% roztworem NaCl i ponownie wirowano. Do uzyskanego osadu dodawano TBS z 1% SDS (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1% SDS; pH 7.5). Następnie do plazm i ekstraktów plemnikowych dodawano 1/100 objętości inhibitora proteaz i fosfataz - Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA). Próby przechowywano w -80ºC do czasu kolejnych analiz.

3.2. Koncentracja plemników

Pomiaru koncentracji dokonywano przy pomocy mikroskopu świetlnego oraz komory Bürkera. Odpowiednią ilość nasienia rozcieńczano najpierw 0,85% chlorkiem sodu (NaCl). Następnie na szkiełko podstawowe nanoszono jedną kroplę nasienia i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Plemniki zliczano manualnie w 20 kwadratach komory ułożonych po 10 na dwóch przekątnych siatki. Po uzyskaniu wyników wyliczano średnią przypadającą na pojedynczy duży kwadrat.

Po wyliczeniu koncentracji plemników wszystkie próby doprowadzano do koncentracji wynoszącej $200x10^6$ plemników/ml. Używano do tego rozcieńczalnika Extendyl (IMV Technologies, L'Aigle, Francja).

3.3. Parametry ruchliwości plemników (CASA)

Ocenę ruchliwości plemników przeprowadzono przy użyciu systemu analizy komputerowej CASA (Hamilton-Thorne Research, HTR, IVOS version 12.3; Beverley, MA, USA). Ustawienia systemu były dostosowane do nasienia indora.

W celu oszacowania ruchliwości próby rozrzedzano ją do koncentracji $30x10^6$ plemników/ml za pomocą buforu służącego do aktywacji ruchu plemników (50 mM TRIS, 130 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM glukoza, 0,5% BSA; pH 7,4). Przygotowane roztwory ogrzewano w termostacie (Thermo Block TDB-120, Biosan, Polska) o temperaturze 38ºC przez co najmniej 15 minut. Następnie do komory Maklera nanoszono 10 µl otrzymanej mieszaniny i dokonywano oceny ruchliwości i parametrów kinetycznych plemników. Czynnikami poddanymi analizie były: odsetek plemników ruchliwych (TMOT), odsetek

plemników o ruchu postępowym (PMOT), średnia prędkość plemnika (VAP), prędkość ruchu prostoliniowego (VSL), prędkość ruchu krzywoliniowego (VCL), amplituda bocznych odchyleń główki (ALH), średnia częstotliwość bocznych odchyleń główki (BCF), prostoliniowość (STR) i liniowość ruchu (LIN).

3.4. Ocena żywotności plemników

3.4.1. Ocena integralności błon komórkowych plemników w rejonie akrosomowym

Integralność błon komórkowych (PMI) plemników oceniano wykorzystując podwójne barwienie fluorochromami SYBR-14 i jodkiem propidyny (PI) (Live/Dead Sperm Viability Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) według metody zaproponowanej przez **Garnera i Johnsona (1995)** z modyfikacjami **(Fraser i in. 2002).**

W pierwszej kolejności próby nasienia doprowadzano do koncentracji $30x10^6$ plemników/ml za pomocą buforu HEPES/BSA (10 mM HEPES, 130mM NaCl, 4mM KCl, 14 mM fruktoza, 1 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, i 0,1% BSA; pH 7,4). Następnie do 100 µl próby badanej dodawano 1 µl roztworu SYBR-14 (1 mM SYBR-14 w DMSO) i inkubowano w termostacie (Thermo Block TDB-120, Biosan, Polska) przez 10 minut w temperaturze 38ºC. Kolejno do prób dodawano 1 µl roztworu jodku propidyny (2,4 µM PI w roztworze Tyrode'a), po czym ponownie inkubowano w takich samych warunkach przez 10 minut.

Przygotowane w ten sposób roztwory oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus CH 30 RF-200, Tokio, Japonia). Na szkiełka podstawowe nakładano 10 µl próby, a następnie przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Dokonywano oceny przynajmniej 100 plemników, w dziesięciu losowo wybranych polach widzenia. Główki plemników wybarwione na zielono (SYBR-14) świadczyły o nieuszkodzonej plazmolemie w rejonie akrosomowym, natomiast świecące na czerwono (PI) o uszkodzonej plazmolemie.

Otrzymane wyniki przedstawiono jako odsetek plemników (%) z nienaruszoną plazmolemą w rejonie akrosomu.

3.4.2. Ocena funkcjonalności mitochondriów plemników

Ocenę funkcjonalności mitochondriów (MMP) w plemnikach przeprowadzono wykorzystując komercyjny zestaw odczynników, w którego skład wchodziły dwa związki: jodek-5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraetylobenzimidazolo-karbocjaniny (JC-1) oraz jodek propidyny (PI) (Mitochondrial Membrane Potential Probe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) według metody **Thomasa i innych (1998)**.

Próby nasienia rozrzedzano do koncentracji $30x10^6$ plemników/ml przy użyciu buforu HEPES/BSA (10 mM HEPES, 130mM NaCl, 4mM KCl, 14 mM fruktoza, 1 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, i 0,1% BSA; pH 7,4). Do 100 µl próby dodawano 1 µl roztworu podstawowego barwnika JC-1 i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 38ºC w termostacie (Thermo Block TDB-120, Biosan, Polska). Następnie do roztworu nasienia dodawano 1 µl PI i ponownie inkubowano w takich samych warunkach.

Tak przygotowane próby oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus CH 30 RF-200, Tokio, Japonia) stosując zielony filtr DMG. Na szkiełka podstawowe nakładano 10 µl próby, a następnie przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Oceniano przynajmniej 100 plemników w dziesięciu losowo wybranych polach widzenia. Plemniki wykazujące pomarańczowo-czerwoną fluorescencję (JC-1) wstawki uznawano za żywe z wysoką funkcjonalnością mitochondriów, podczas gdy plemniki wykazujące czerwoną fluorescencję (PI) główki i zieloną fluorescencję wstawki zostały sklasyfikowane jako plemniki martwe lub nieruchliwe z niskim potencjałem błony mitochondrialnej.

Otrzymane wyniki przedstawiono jako odsetek plemników (%) z funkcjonalnymi mitochondriami.

3.4.3. Ocena zmian apoptotycznych plemników

Zmiany apoptotyczne plemników oceniono przy użyciu komercyjnej mieszaniny barwników fluorochromowych: YO-PRO-1 i jodku propidyny (PI) (Vybrant Apoptosis Assay Kit #4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) **(Trzcińska i Bryła 2015, Wasilewska i Fraser 2017)**.

Próby nasienia doprowadzano do koncentracji $30x10^6$ plemników/ml za pomocą buforu HEPES/BSA (10 mM HEPES, 130mM NaCl, 4mM KCl, 14 mM fruktoza, 1 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, i 0,1% BSA; pH 7,4). W dalszej kolejności dodawano 0,5 µl roztworu

barwnika YO-PRO-1 i 0,5 µl roztworu PI oraz ponownie inkubowano w temperaturze 38ºC przez 10 minut.

Przygotowane w ten sposób próby oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus CH 30 RF-200, Tokio, Japonia). Na szkiełka podstawowe nakładano 10 µl próby, a następnie przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Dokonywano oceny przynajmniej 100 plemników, w dziesięciu losowo wybranych polach widzenia. Plemniki z wybarwioną na czerwono główką klasyfikowano jako nekrotyczne. Te z główkami czerwono-zielonymi jako plemniki we wczesnym stadium nekrozy. Z kolei plemniki z zielonymi główkami były klasyfikowane jako wczesnoapoptotyczne. Plemniki z niewybarwioną główką oraz pomarańczowo-czerwoną wstawką klasyfikowano jako żywe, bez zmian apoptotycznych.

Wyniki podawano jako odsetki plemników (%) żywych, apoptotycznych i nekrotycznych.

3.4.4. Detekcja tlenku azotu (NO) w plemnikach

Badanie przy użyciu barwnika fluorescencyjnego dioctanu-4,5-diaminofluoresceiny (DAF-2DA) (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA) przeprowadzono zgodnie z metodyką zaproponowaną przez **Lampiao i innych (2006)** z modyfikacjami.

Próby nasienia rozrzedzano do koncentracji $30x10^6$ przy użyciu buforu HEPES/BSA (10 mM HEPES, 130mM NaCl, 4mM KCl, 14 mM fruktoza, 1 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, i 0,1% BSA; pH 7,4). Potem do 100 µl próby dodawano 100 µl roztworu DAF-2DA (20 µM DAF-2DA w PBS) i inkubowano w temperaturze 38ºC przez dwie godziny w ciemności.

Tak przygotowane próby (10 µl) nakładano na szkiełka podstawowe, a następnie przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Oceniano je pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus CH 30 RF-200, Tokio, Japonia) z niebieskim filtrem DMB. Oceniano przynajmniej 100 plemników, w dziesięciu losowo wybranych polach widzenia. Plemniki wykazujące niebiesko-zieloną fluorescencję w dowolnym segmencie uznawano za komórki generujące NO.

Wynik wyrażano jako odsetek (%) plemników w polu widzenia, które były zdolne do wytwarzania NO.

3.5. Oznaczanie zawartości białka całkowitego metodą Bradforda (1976)

Zawartość białka całkowitego oznaczano wykorzystując odczynnik Bradforda (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA) zawierający w swoim składzie błękit kumazyny. Białko znajdujące się w próbach łącząc się, z tym właśnie barwnikiem, tworzy kompleksy powodując przesunięcie maksimum absorbcji barwnika z 465 nm do 595 nm. Wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do zawartości białka w badanych roztworach.

Zawartość białka całkowitego w próbach oznaczano poprzez dodawanie 1,5 ml odczynnika Bradforda do probówek w których znajdowało się 5 µl próby oraz 45 µl 0,85% NaCl. Tak przygotowane próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Pomiaru absorbancji dokonywano na spektrofotometrze UV-Vis DU 800 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) przy długości fali 595 nm w odniesieniu do próby kontrolnej (50 µl 0,85% NaCl, 1,5 ml odczynnika Bradforda). Wyniki odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej z wykorzystaniem albuminy surowicy bydlęcej.

3.6. Oznaczanie aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych

3.6.1. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) plazm i ekstraktów plemnikowych nasienia indorów przeprowadzano za pomocą komercyjnego zestawu Ransod (Randox, Crumlin, UK) zgodnie z instrukcją podaną przez producenta.

Wykorzystana metoda opiera się na zdolności do generowania anionorodników ponadtlenkowych przez ksantynę i oksydazę ksantynową (XOD). Powstałe cząsteczki reagują z chlorkiem 2-(4-jodofenylo)-3-(4-nitrofenol)-5-fenylotetrazoliowym (INT) tworząc formazan – produkt o barwie czerwonej. Przyjęto, że jednostka aktywności SOD powoduje 50% inhibicję poziomu redukcji INT w temperaturze 37ºC i pH 7,0.

Do kuwet spektrofotometrycznych najpierw dodawano 50 µl próby oraz 1,7 ml substratu (roztwór R_{1a} w 20 ml R_{1b}). Zawartość kuwet dokładnie mieszano, a następnie dodawano do nich 250 µl oksydazy ksantynowej (roztwór R_2 w 10 ml wody dejonizowanej). Zawartość kuwet ponownie mieszano i po upływie 30 sekund od dodania XOD dokonywano pomiaru spektrofotometrycznego (Beckman Coulter, UV-Vis DU 800, Brea, CA, USA) otrzymując odczyt absorbancji początkowej (A_1), zaś po upływie 3 minut końcowej (A_2).

Pomiar przeprowadzono przy długości fali 505 nm wobec powietrza. Komora spektrofotometru miała stałą temperaturę wynoszącą 37ºC. Wartość aktywności SOD wyliczano z poniższego wzoru po zmierzeniu tzw. próby kontrolnej:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \frac{\Delta A}{\min}$$

$$100 - \frac{(\frac{\Delta A_{próby}}{\min} * 100)}{\frac{\Delta A_{S1}}{\min}} = SOD\ [\%]$$

Zakładając, że prawidłowa inhibicja powinna wynosić pomiędzy 30% a 60%, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (U/ml) odczytywano z uprzednio sporządzonej krzywej wzorcowej.

3.6.2. Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx)

Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej przeprowadzano wykorzystując zestaw Ransel (Randox, Crumlin, UK) zgodnie z zaleceniami podanymi przez producenta.

Metoda wykorzystuje właściwości katalityczne GPx względem utleniania glutationu (GSH) przez wodorotlenek kumenu. Utleniony glutation (GSSG) w obecności reduktazy glutationowej i NADPH ulega przekształceniu do zredukowanej formy.

W kuwetach umieszczano 20 µl próby, 1 ml odczynnika R_1 oraz 40 µl odczynnika R_2. W próbie zerowej zamiast próby umieszczano 10 µl wody dejonizowanej. Wszystkie próby przed badaniem dokładnie mieszano. Pomiaru w spektrofotometrze UV-Vis DU 800 dokonywano w temperaturze 37ºC przy długości fali 340 nm. Wartości absorbancji mierzono trzykrotnie. Pierwszy raz po upływie 1 minuty dokonywano pomiaru absorbancji początkowej (A_0), następne po upływie 2 (A_1) i 3 minut (A_2). Wyniki aktywności GPx wyliczano ze wzorów:

$$(A_0 - A_1) + (A_1 - A_2) = \frac{\Delta A}{\min}$$

$$\left(\frac{\Delta A_{p.\ badanej}}{\min} - \frac{\Delta A_{p.\ zerowej}}{\min}\right) * 8\,412 = GPx\ [U/l]$$

3.6.3. Oznaczanie aktywności katalazy (CAT)

Oznaczenia aktywności katalazy dokonano używając komercyjnego zestawu odczynników Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA) według instrukcji podanej przez producenta.

Metoda opiera się na pomiarze poziomu nadtlenku wodoru (H_2O_2) pozostałego po działaniu CAT. Kolorymetrycznie oznaczany jest kwas 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonowy, który łączy się z 4-aminoantypiryną w obecności H_2O_2 oraz peroksydazy chrzanowej (HRP), tworząc czerwony produkt.

Do probówek dodawano 30 µl próby, 75 µl rozcieńczonego Assay bufor oraz 12,5 µl 200 mM H_2O_2. Tak sporządzoną mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut, po czym dodawano 450 µl roztworu azydku sodu. Zawartość probówek mieszano i przenoszono 10 µl do kuwet, w dalszej kolejności dodając 1 ml odczynnika wywołującego barwę – chromogenu. Próby ponownie inkubowano w temperaturze 25ºC przez 15 minut. Próbę zerową wykonywano analogicznie zastępując objętość próby rozcieńczonym Assay bufor. Po upływie wyznaczonego czasu odczytywano absorbancję przy 520 nm. Wartości odczytywano z krzywej wzorcowej. Aktywność katalazy wyliczano ze wzoru:

$$\mathrm{A}_{\text{zerowej}} - \mathrm{A}_{badanej} = \mu M\ H_2O_2$$

$$\frac{\mu M\ H_2O_2 * rozcieńczenie\ próby * 100}{(0{,}015 * 5)} = CAT\ \ [\frac{\frac{\mu M}{min}}{ml}]$$

3.7. Oznaczanie zawartości zredukowanej formy glutationu (GSH)

Zawartość zredukowanej formy glutationu (GSH) oznaczano przy użyciu zestawu odczynników Bioxytech GSH-400 (AOXRE Bio-Sciences, Burlingame, CA, USA) tak jak to zaleca producent.

Metoda oznaczana GSH bazuje na dwuetapowej reakcji chemicznej. Pierwszy z nich prowadzi do powstania tioeterów między używanym odczynnikiem R_1 (4-chloro-1-metylo-7-trifluorometylo-chinolinowy metylosiarczanem) a tiolami obecnymi w próbie. Drugim etapem jest zachodząca w warunkach alkalicznych reakcja eliminacji. Pośredniczy w niej

odczynnik R_2 (30% NaOH), który przekształca tioeter otrzymany z GSH w chromoforowy tion o maksymalnej długości fali absorbancji wynoszącej 400 nm.

Przed przystąpieniem do właściwej procedury próby odbiałczano przy pomocy 5% kwasu metafosoforowego dodawanego w objętości 3:1. Następnie 50 µl odbiałczonej próby uzupełniano „buforem 3" (fosforan potasu z kwasem dietylenotriaminopenataoctowym) do objętości 900 µl. Po czym dodawano 50 µl odczynnika R_1 i taką samą objętość odczynnika R_2 mieszając próby za każdym razem. Tak przygotowane mieszaniny inkubowano w temperaturze 25ºC bez dostępu światła przez 10 minut. Próbę zerową wykonywano analogicznie zastępując objętość próby „buforem 3". Absorbancję mierzono przy długości fali 400 nm. Zawartość GSH obliczano według wzoru, gdzie molowy współczynnik absorbancji wynosi 15 460, używane kuwety miały przekrój 1 cm, a próby rozcieńczono 40-krotnie:

$$\frac{(A - A_{zerowa})}{15\,460 * 1} * 40 = GSH\ [M]$$

3.8. Oznaczanie zawartości malondialdehydu (MDA)

Do oznaczeń wykorzystywano kit Bioxytech MDA-586 (AOXRE Bio-Sciences, Burlingame, CA, USA) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

Metoda opiera się na reakcji chromogennego odczynnika R_1 (N-metylo-2-fenyloindol - NMPI) z MDA w temperaturze 45ºC. Jedna cząsteczka malonylodialdehydu reaguje z dwiema cząsteczkami NMPI tworząc stabilny niebieski barwnik - karbocyjaninę. Reakcja przeprowadzana jest w obecności kwasu chlorowodorowego (R_2) i probucolu, aby zapobiec reakcjom 4-hydroksyalkenów z 4-hydroksynonenalem (HNE).

W probówkach umieszczano 5 µl probucolu, 100 µl próby, 320 µl odczynnika R_1 (roztwór odczynnika R_1 w 100% metanolu - stosunek 3:1) oraz 75 µl odczynnika R_2. Roztwory mieszano i inkubowano w termostacie przez godzinę w temperaturze 45ºC. Następnie próby wirowano przez 10 minut w temperaturze 15ºC przy 10 000 x g. Próbę zerową wykonywano analogicznie zastępując objętość próby wodą dejonizowaną. Pomiaru absorbancji dokonywano w temperaturze pokojowej wobec powietrza, przy długości fali 586 nm.

$$\mathrm{A}_{\text{badanej}} - \mathrm{A}_{zerowej} = \mathrm{A}_{badanej\ z\ krzywej}$$

Wartości ekstynkcji odczytywano z krzywej, a zawartość wyliczano według wzoru:

$$\frac{A_{badanej\ z\ krzywej} - 0{,}0038}{0{,}120} * 5 = MDA\ \ [\mu M]$$

3.9. Pomiar aktywności fosfataz alkalicznej (ALP) i kwaśnej (ACP)

Oznaczanie aktywności ALP i ACP wykonano wykorzystując metodę opisaną przez **Bessey'a i innych (1946)**.

Fosfataza alkaliczna w obecności jonów Mg^{2+} hydrolizuje p-nitrofenylofosforan disodowy do p-nitrofenolu i ortofosforanu. P-nitrofenol w środowisku zasadowym zachowuje się jak wskaźnik dając żółte zabarwienie. Aktywność enzymu jest proporcjonalna do intensywności zabarwienia. W analogiczny sposób, ale z wykorzystaniem kwaśnego roztworu substratu dokonywany jest pomiar aktywności ACP.

W celu pomiaru aktywności ALP do szklanych probówek dodawano 250 µl zasadowego roztworu substratu (8 mM fenylofosforan disodowy, 56 mM weronal sodu, pH 9,3) oraz 25 µl próby badanej. Natomiast w celu oznaczenia ACP do probówek dodawano 275 µl kwaśnego roztworu substratu (8 mM fenylofosforan disodowy, 40 mM kwas cytrynowy, 70 mM cytrynian sodu; pH 4,9) oraz 50 µl próby badanej. Próby zerowe wykonywano analogicznie do badanych zastępując objętość prób wodą dejonizowaną. Wszystkie próby inkubowano 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37ºC. W celu zahamowania reakcji do prób dodawano roztwory wodorotlenku sodu (NaOH), przy czym do prób, gdzie oznaczano aktywność ALP - 2,5 ml 0,02N NaOH, a do tych, w których oznaczana była ACP - 1 ml 0,1N NaOH. Pomiaru absorbancji dokonywano w spektrofotometrze UV-Vis DU 800 wobec prób zerowych przy długości fali 410 nm. Następnie wyniki ekstynkcji odczytywano z krzywych wzorcowych w jednostkach Bessey'a-Lowry'ego-Brocka (BLB), przeliczając na jednostki międzynarodowe przy użyciu współczynnika przeliczeniowego - 16,67.

3.10. Izolacja fosfoprotein z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa do jonów Fe^{3+} na złożu PHOS-Select Iron Affinity Gel

Izolując fosfoproteiny z plazm nasienia i ekstraktów plemnikowych wykorzystano procedurę opierającą się na chromatografii powinowactwa. Wykorzystano do tego celu złoże PHOS-Select Iron Affinity Gel (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA).

Do probówek nakładano 40 µl złoża i poddawano je najpierw trzykrotnej ekwilibracji przy użyciu 500 µl buforu A (250 mM kwas octowy, 30% acetonitryl; pH 2,9). Po każdorazowym dodaniu odczynnika wszystkie próby mieszano i wirowano w mikrowirówce Microfuge 22R (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) przy 10 000 x g przez 30 sekund. Z każdym razem powstałe supernatanty usuwano. Do wyekwilibrowanego złoża dodawano 500 µl próby standaryzowanej do zawartości białka – 2 mg/ml – przy pomocy buforu A. Następnie probówki umieszczano na kołysce laboratoryjnej i mieszano ich zawartości w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Próby wirowano przy 10 000 x g przez 30 sekund. Powstały supernatant usuwano i dodawano 500 µl buforu A. Próby ponownie wirowano w identycznych warunkach i dekantowano powstałe supernatanty. W dalszej kolejności do osadów dodawano wodę dejonizowaną o objętości 500 µl i probówki wirowano. Po raz kolejny supernatant usuwano, przechodząc do ostatniego etapu tj. elucji izolowanych fosfoprotein. W tym celu do powstałych osadów dodawano 100 µl buforu B (400 mM amoniak). Wirowano próby po raz ostatni (w warunkach jak wyżej). Powstałe supernatanty przenoszono do nowych, opisanych probówek, po czym zamrażano je w -80ºC.

3.11. Analiza mas cząsteczkowych fosfoprotein plazm nasienia oraz ekstraktów plemnikowych za pomocą różnych rodzajów rozdziałów elektroforetycznych

3.11.1. Elektroforeza fosfoprotein nasienia w warunkach natywnych (Native-PAGE)

Analiza fosfoprotein w warunkach natywnych pozwala zachować naturalną strukturę białek oraz ich aktywność biologiczną. Białka przy tej metodzie zostały rozdzielone na podstawie stosunku ładunku do ich masy. Rozdział fosfoprotein w warunkach natywnych przeprowadzono posługując się metodyką podaną przez **Laemmli (1970)** z modyfikacją wykluczającą udział składników denaturujących.

Przystępując do rozdziału metodą Native-PAGE brano pod uwagę fakt, iż nie jest ona przeznaczona do analizy mas cząsteczkowych białek, jednak postanowiono porównać profile wykonane tą techniką z profilami uzyskanymi pozostałymi metodami elektroforetycznymi.

Podczas rozdziału wykorzystywano 12% żele poliakrylamidowe zastępując używany standardowo detergent tą samą objętością wody dejonizowanej. Próby przygotowywano poprzez dodanie 10 µl roztworu wcześniej wyizolowanych fosfoprotein do 2 µl buforu obciążającego (10% glicerol, 0,01% błękit bromofenolowy). Następnie całość nanoszono do studzienek w żelu. Separację białek przeprowadzano w aparacie Mini-Protean II Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) wypełniając komorę buforem do elektroforezy PAGE (50 mM Tris, 250 mM glicyna; pH 8,3). Napięcie prądu w czasie trwania rozdziału było początkowo równe 80 V, a następnie po przejściu prób w żel rozdzielający zmieniane było na 130 V. Do oszacowania ruchliwości elektroforetycznych rozdzielanych fosfoprotein używano standardów Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Żele po zakończeniu rozdziału barwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250 (30% metanol, 5% kwas octowy, 0,1% CBB R-250) (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA) przez całą dobę. Następnie żele odbarwiano za pomocą roztworu zawierającego 5% metanol i 7% kwas octowy. Po odbarwieniu żele analizowano densytometrycznie za pomocą programu Multi-Analyst (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.11.2. Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących z dodatkiem Tricine (Tricine-PAGE)

Rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących z dodatkiem trycyny (N-[Tris(hydroksymetylo)metylo]glicyny) wykorzystywany jest do rozdziału przede wszystkim białek niskocząsteczkowych o masach poniżej 40 kDa. W szczególności w przypadkach, gdy w rozdziale SDS-PAGE omawiane frakcje nie rozdzielają się wystarczająco.

Separację białek metodą Tricine-PAGE przeprowadzano używając żeli trójwarstwowych. Pierwszą, dolną warstwą stanowiąca około połowę wysokości żelu był 15% poliakrylamidowy żel rozdzielający, środkową warstwę stanowił żel 10%, a ostatnią górną - żel zagęszczający 4%. Żele przygotowywano po kolei, poczynając od położonego najniżej. Po wylaniu poszczególne warstwy przykrywano wodą dejonizowaną, którą

usuwano przed naniesieniem kolejnej warstwy żelu. Podczas rozdziału używano dwóch buforów elektrodowych tj. buforu anodowego (0,2 M Tris) i katodowego (0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS). Do 10 µl wcześniej wyizolowanych fosfoprotein dodawano 2 µl buforu lizującego (1 M Tris-HCl, 20% SDS, 20% glicerol, 2% β-merkaptoetanol, 2% błękit bromofenolowy; pH 6,8) i umieszczano w termostacie w temperaturze 95ºC na 5 minut. Następnie całość zawiesin nanoszono do studzienek żeli. Napięcie prądu w czasie trwania rozdziału było początkowo równe 80 V, a następnie po przejściu prób w żel rozdzielający zmieniane było na 130 V. Do wyznaczenia mas cząsteczkowych rozdzielonych fosfoprotein używano standardów Precision Plus Protein Standards. Żele po zakończeniu rozdziału barwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250 przez całą dobę. Następnie odbarwiano żel za pomocą roztworu zawierającego 5% metanol i 7% kwas octowy. Po odbarwieniu żele analizowano densytometrycznie za pomocą programu Multi-Analyst.

3.11.3. Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących z dodatkiem mocznika (Urea-PAGE)

Metoda elektroforetyczna z dodatkiem mocznika najczęściej używana jest w celu rozdziału białek niskocząsteczkowych do 50 kDa oraz do rozdziału białek budujących błony plazmatyczne. Oprócz tego lepszemu rozdziałowi ulegają białka o właściwościach hydrofobowych.

Elektroforezę Urea-PAGE przeprowadzano podobnie do elektroforezy SDS-PAGE. Wyjątkiem była dokładna kompozycja używanych żeli. W tym przypadku warstwę rozdzielającą żelu stanowił 10% roztwór składający się z 30% mieszaniny akrylamidów, buforu rozdzielającego do żelu (4x stężonego), 8 M mocznika, wody dejonizowanej, 10% nadsiarczanu amonu (APS) i N,N,N′,N′-tetrametyloetylenodiaminy (TEMED). Do przygotowania 5% żelu zagęszczającego niezbędny był tzw. bufor zagęszczający do żelu. Dalsza część proceduralna była taka sama jak w przypadku elektroforez opisanych powyżej.

3.11.4. Elektroforeza jednokierunkowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) fosfoprotein nasienia.

Elektroforeza w warunkach denaturujących pozwala na dokładną analizę mas cząsteczkowych białek. Dzięki obecności dodecylosiarczanu sodu (SDS) wszystkie

cząsteczki białek mają nadany ujemny ładunek, dzięki czemu prędkość rozdziału jest wprost proporcjonalna do wielkości zdenaturowanych cząsteczek. Elektroforezę SDS-PAGE wykonano zgodnie z metodą **Laemmli (1970).**

Rozdział SDS-PAGE wykonywano na 12% żelach poliakrylamidowych w aparacie Mini-Protean II Cell wypełniając komorę buforem do elektroforezy SDS-PAGE (50 mM Tris, 250 mM glicyna, 0,5% SDS; pH 8,3). Dalsza część proceduralna była taka sama jak w przypadku elektroforez opisanych powyżej.

3.11.5. Elektroforeza dwukierunkowa denaturująca (2D-PAGE) fosfoprotein nasienia

40 µl wyizolowanych wcześniej fosfoprotein plazm nasienia i ekstraktów plemnikowych zawieszano w 160 µl buforu SBR (7 M mocznik, 2 M tiomocznik, 2% CHAPS, 1% amfolity, 0,2% błękit bromofenolowy, 20 mM DDT). Następnie całość poszczególnych prób nanoszono na rowki kasety aparatu do izoelektroogniskowania Protean i12 IEF System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), w których umieszczano paski ZOOM IPG Strips - pH 3-10L (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pozwalające na rozdzielanie białek w pH między 3 a 10. Najpierw przez 12 godzin następował pierwszy etap, czyli rehydratacja pasków a potem drugi, czyli izoelektroogniskowanie (IEF). Po zakończeniu IEF paski wyciągano i ekwilibrowano przez 30 minut w roztworze BDE (6 M mocznik, 2% SDS, 375 mM Tris, 20% glicerol, 0,2% błękit bromofenolowy, 2% DDT). Następnie paski umieszczano w studzienkach 12% żeli poliakrylamidowych, przygotowanych zgodnie z metodyką elektroforezy 2D-PAGE. Dalszy etap obejmujący rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących przeprowadzano według wcześniej podanej metody SDS-PAGE. Żele analizowano densytometrycznie za pomocą programu PDQuest (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.12. Elektrotransfer (Western Blotting) i immunodetekcja fosfoprotein

Fosfoproteiny poddawano rozdziałowi w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) a następnie przeprowadzano elektrotransfer białek na membrany. W przypadku tej metody używano 0,5 µl standardów biotynylowanych Biotinylated Molecular Weight Marker (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA). Do elektrotransferu używano membran

z polifluorku winylidenu (PVDF) (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Membrany zanurzano najpierw w metanolu, a następnie umieszczano w buforze do transferu (50 mM Tris, 250 mM glicyna, 20% metanol), zanurzając w nim również bibuły do transferu o wielkości równej powierzchni żelu na 15 minut. Próby poddawano półsuchemu transferowi w aparacie Semi-Dry Blotter (Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA) stosując stałe natężenie prądu wynoszące 1 mA/cm^2 membrany przez godzinę.

W dalszej kolejności membrany inkubowano w temperaturze pokojowej przez dwie godziny w roztworze płuczącym (20 mM Tris, 136 mM NaCl, 0,1% Tween-20; pH 7,5) zawierającym 2% albuminę surowicy bydlęcej (BSA). Po upływie czasu inkubacji membrany PVDF przemywano trzykrotnie przez 5 minut buforem płuczącym. Następnie poddawano je kolejnej inkubacji trwającej co najmniej 12 godzin w 4ºC na kołysce laboratoryjnej w buforze płuczącym (50 ml) z dodatkiem wybranych biotynylowanych przeciwciał monoklonalnych. Używano trzech rodzajów przeciwciał: anty-fosfoserynowych (rozcieńczonych 1:300 000), anty-fosfotreoninowych (rozcieńczonych 1:60 000) lub anty-fosfotyrozynowych (rozcieńczonych 1:50 000). Następnego dnia membrany ponownie przemywano buforem płuczącym, a potem inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w buforze z dodatkiem 50 µl streptawidyny skoniugowanej z alkaliczną fosfatazą (Vector Laboratories, Newark, CA, USA). Po inkubacji membrany ponownie przemywano buforem płuczącym (3 x 5 minut), a następnie przemywano wodą dejonizowaną (1 minuta). Bibuły ostatecznie wybarwiano poprzez dodanie do 10 ml buforu do alkalicznej fosfatazy (100 mM Tris, 100 mM NaCl; pH 9,5) 200 µl mieszaniny błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) i fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolu (BCIP) (NBT/BCIP Stock Solution, Sigma-Aldrich, Merck, Burlington, MA, USA). Membrany pozostawiano w mieszaninie do uzyskania optymalnej barwy wybarwionych frakcji a następnie suszono je na powietrzu. Masy cząsteczkowe wybarwionych frakcji fosfoproteinowych określano analizując membrany za pomocą oprogramowania Multi-Analyst (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

3.13. Identyfikacja fosfoprotein nasienia za pomocą spektrometrii mas Nano LC-MS/MS

Wycięte fragmenty żelu wykonanego metodą SDS-PAGE poddano kolejno procedurom odbarwiania, redukcji, alkilacji i trawienia. Na wstępie prążki zanurzano w 50 µl roztworu węglanu amonu (100 mM) po czym wytrząsano je w termobloku przez 10 minut.

Następnie do probówek dodawano 50 µl acetonitrylu i wytrząsano przy 600 rpm przez następne 10 minut. Otrzymany supernatant usuwano, a fragmenty żelu poddano dehydratacji dodając 100% acetonitryl i wytrząsając je ponownie w tych samych warunkach. W dalszej kolejności fragmenty żelu zalewano 50 µl wodnego roztworu ditiotreitolu (DTT). Redukcję przeprowadzano w ciągu 10 minut w temperaturze wynoszącej 90ºC. Następnie do materiału dodawano 50 µl 5 mM roztworu jodoacetamidu w 100 mM buforze węglowym. Alkilacja przebiegała w termobloku w warunkach: temperatura – 90ºC, czas – 10 minut, częstotliwość obrotów – 600 rpm. Po zakończeniu procesu alkilacji roztwór jodoacetamidu usuwano, a prążki ponownie odwadniano przy użyciu acetonitrylu.

W kolejnym etapie do prób wprowadzano po 1,5 pmol trypsyny (Promega, Madison, WI, USA). Rehydratacja trwała 5 minut. Następnie materiał inkubowano przez całą noc w buforze węglanowym w termobloku z ustawionym termostatem na 37ºC. Kolejnego dania przeprowadzono ekstrakcję peptydów przy użyciu 50 mM buforu węglanowego oraz dwukrotnie roztworem 5% kwasu mrówkowego w 50% acetonitrylu. Każdy etap ekstrakcji trwał 15 minut i odbywał się w temperaturze 37ºC. Wszystkie otrzymane frakcje zawierające wymyte peptydy łączono. Ekstrakt osuszano w liofilizatorze a następnie rozpuszczano w 30 µl roztworu 4% acetonitrylu z 0,1% kwasem mrówkowym.

Analizę Nano LC-MS/MS wykonano przy użyciu systemu Ultimate 3000 HPLC/UPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) połączonego on-line ze spektrometrem masowym Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w trybie jonów dodatnich. Próby o objętości 5 µl nastrzyknięto do systemu składającego się z prekolumny RP C18 (0,3x5mm, złoże o średnicy ziaren 5 µm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), i kolumny RP C18 (15 cm, złoże o średnicy ziaren 3 µm, 75 µm) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 300 nl/min. Próby eluowano przy użyciu 33 minutowego gradientu roztworów A (0,1% kwas fluorooctowy w wodzie) i B (0,1% kwas fluorooctowy w acetonitrylu). Gradient ustawiono tak, aby na początku (t = 0 minut) oraz po 4 minutach udział roztworu B wynosił 8%, po 30 minutach – 35%, po 30 minutach i 30 sekundach oraz 31 minutach i 30 sekundach – 90%, a następnie wrócił do 8% w 32 i 33 minucie.

3.14. Identyfikacja fosfoprotein nasienia za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF

Trawienie wykonano używając gotowego kitu Trypsin Gold (Promega, Madison, WI, USA) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

Wybrane fragmenty żeli, wykonanych wcześniej metodą 2D-PAGE odbarwiano dodając 200 µl Destaining Solution (100 mM NH4HCO3 w 50% acetonitrylu) po czym inkubowano je przez 45 minut w temperaturze 37ºC. Procedurę powtarzano trzykrotnie. Następnie przechodzono do dehydratacji prób za pomocą 100% acetonitrylu, którego 100 µl dodawano do każdej probówki i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 5 minut. W celu przeprowadzenia redukcji do probówek wprowadzano 20 µl 50 mM roztworu DTT. Następnie próby wytrząsano (900 rpm, 10 minut, 90ºC). Po zakończeniu procesu dodano do nich 20 µl roztworu do alkilacji (50 mM jodoacetamid, bufor węglanowy, pH 7,5) i ponownie inkubowano w temperaturze 90ºC przez 10 minut. Przed przystąpieniem do dalszych procedur obniżano temperaturę prób, w dalszej kolejności usuwano supernatant. Pozostałe osady przemywano przy użyciu 50 mM NH4HCO3 w ilości 100 µl, po czym wirowano je przy 10 000 rpm. Ponownie usuwano płyn znad osadu. Próby zalewano tym razem 100 µl acetonitrylu i pozostawiano je na 2 minuty. Po pływie czasu acetonitryl znad prób usuwano, a probówki umieszczano w wirówce próżniowej w celu wysuszenia ich z pozostałości płynu. Wirowano je 5 minut.

Wysuszone skrawki żelu zawieszano w 20 µl roztworu Trypsin Gold z wcześniej wspomnianego zestawu odczynników i pozostawiano je w temperaturze pokojowej na około godzinę. W następnym etapie przystępowano do wprowadzenia buforu trawiącego składającego się z 40 mM NH4HCO3 w 10% acetonitrylu. Następnie próby inkubowano przez całą noc w termobloku ustawionym na 37ºC. Następnego dnia rozpoczynano od ponownego suszenia prób w wirówce próżniowej. W dalszej kolejności trzykrotnie do skrawków dodawano 50 µl roztworu składającego się z 50% acetonitrylu i 5% kwasu trifluorooctowego za każdym razem inkubując je przez godzinę w temperaturze pokojowej. Tym razem pozostawiano supernatanty przenosząc je do nowych, czystych probówek i zagęszczano je wykorzystując ponownie wirówkę próżniową (max 30ºC, 1000 rpm, 2-4 godziny).

Płyny następnie oczyszczano za pomocą końcówek do pipet ZipTip® C18 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) zgodnie z instrukcją producenta dołączoną do zestawu.

Końcówki uprzednio przygotowano do wykonania procedury. Eluowane białka po wykorzystaniu roztworu 70% acetonitrylu w 0,1% kwasu trifluorooctowego przenoszono do wysterylizowanych probówek.

W analizach spektrometrycznych wykorzystano matrycę 2,5-DHB (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy) W celu przygotowania matrycy w probówce umieszczano 10 mg gotowej matrycy DHB oraz 1 ml roztworu składającego się z 30% acetonitrylu, 1% kwasu ortofosforowego oraz 0,1% kwasu trifluorooctowego i wody.

Na specjalną metalową płytkę (MTP 384 Ground Steel Target BC, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), na kolejne dołki nanoszono po 1 µl próby i matrycy. W dalszej kolejności czekano aż próby na płytce zupełnie wyschną i przechodzono do analizy spektrometrycznej metodą MALDI-TOF/TOF w aparacie Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF/TOF (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Uzyskane wyniki w oparciu o program MASCOT (Matrix Science, USA) zestawiano w oparciu o bazy danych sekwencji białkowych.

3.15. Charakterystyka zidentyfikowanych fosfoprotein

Zidentyfikowane białka opisano przy pomocy ogólnodostępnych darmowych baz internetowych takich jak NCBI (Entrez Proteins, NLM, Bethesda, MD, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez), UniProt (http://www.uniprot.org) oraz PhosphoSitePlus® (wersja 6.7.1.1, https://www.phosphosite.org).

Nie wszystkie białka, zidentyfikowane w ramach niniejszej pracy, są przypisane w wyżej wymienionych bazach proteomicznych dla gatunku indora (*Meleagris gallopavo*) lub innych przedstawicieli drobiu grzebiącego (np.: *Gallus gallus* czy *Coturnix japonica*). Toteż podczas przeprowadzania analiz funkcjonalnych zostały one zastąpione przez ich ludzkie (*Homo sapiens*) ortologi.

3.16. Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych fosfoprotein

W pierwszej kolejności dokonano określenia ontologii genów (GO) kodujących wybrane fosfoproteiny obecne w nasieniu indora. Do tego celu wykorzystano program ShinyGo (wersja 0.77, http://bioinformatics.sdstate.edu/go/). Białka występujące

w fosfoproteomie nasienia indora podzielono ze względu na pełnione przez nie funkcje biologiczne.

Ponieważ sygnalizacja komórkowa jest w głównej mierze zależna od specyficznych oddziaływań występujących pomiędzy resztami aminokwasowymi sąsiadujących białek przeprowadzono także analizę interakcji białko-białko. Do analizy omawianych interakcji, występujących pomiędzy fosfoproteinami nasienia indora, wykorzystano bioinformatyczny program STRING (wersja 11.5, http://string-db.org). Za minimalny wymagany wynik interakcji obrano wartość ≥ 0,4 (średni poziom ufności). Wyszukiwano wszystkie interakcje dla gatunku *Homo sapiens* (największa i na bieżąco aktualizowana baza genów).

3.17. Analiza statystyczna

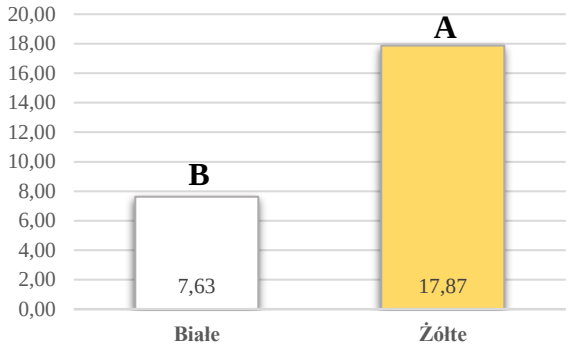
Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując program Statistica (wersja 13.3., StatSoft, TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA). Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błędy standardowe średnich (SEM). Parametry dotyczące gęstości optycznej profili fosfoproteomicznych wyizolowanych fosfoprotein plazm nasienia i ekstraktów plemnikowych uzyskanych metodami immunodetekcji analizowano za pomocą analizy nieparametrycznej za pomocą testu U Manna-Whitneya. Natomiast pozostałe parametry przeanalizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA używając testu Tukeya. Obecność korelacji między analizowanymi parametrami określono poprzez obliczenie współczynników korelacji metodą Pearsona. Zaobserwowane korelacje sklasyfikowano jako słabe (0,21–0,4), umiarkowane (0,41–0,7), silne (0,71–0,9) lub bardzo silne (>0,9).

4. Wyniki

4.1. Analiza parametrów biologicznych plazm i plemników pochodzących z białego i żółtego nasienia indorów

4.1.1. Zawartość białka całkowitego w plazmach pozyskanych z nasienia białego i żółtego

Średnia zawartość białka całkowitego w plazmach nasienia pozyskanych z nasienia białego i żółtego różniła się statystycznie wysoko istotnie ($p \leq 0{,}01$). Plazmy pochodzące od indorów z YSS zawierały ponad dwukrotnie wyższą zawartość białka całkowitego (17,87 mg/ml) w stosunku do plazm nasienia białego, w których średnia zawartość białka wynosiła 7,63 mg/ml **(Wykres 4.1)**.



A, B – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0{,}01$)
a, b - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0{,}05$)

Wykres 4.1 Zawartość białka całkowitego w plazmach białego i żółtego nasienia

4.1.2. Parametry biochemiczne plazm nasienia białego i żółtego

Wykazano występowanie istotnych i wysoko istotnych różnic w wartościach wybranych parametrów biochemicznych charakteryzujących plazmy nasienia pochodzące z białych i żółtych ejakulatów. Plazmy nasienia żółtego wyróżniały się wyższą aktywnością fosfataz kwaśnej i alkalicznej oraz peroksydazy glutationowej, a także wyższą zawartością glutationu i malondialdehydu **(Tabela 4.1).**

Tabela 4.1 Parametry biochemiczne plazm pochodzących z białego i żółtego nasienia. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM

Rodzaj nasienia	Białe	Żółte
Aktywność ACP [U]	6 918,98 ± 1 284,72 ^{b}	11 651,34 ± 1 710,60 ^{a}
Aktywność ALP [U]	26,55 ± 2,32 ^{B}	75,43 ± 4,89 ^{A}
Aktywność SOD [U/ml]	2,19 ± 014	1,90 ± 0,21
Aktywność GPx [U/ml]	0,39 ± 0,02 ^{B}	0,65 ± 0,07 ^{A}
Aktywność CAT [µM/min/ml]	27,64 ± 4,65	29,74 ± 7,92
Zawartość GSH [µM]	437,82 ± 34,14 ^{B}	671,61 ± 47,57 ^{A}
Zawartość MDA [µM]	10,82 ± 1,69 ^{B}	18,91 ± 2,08 ^{A}

$^{A, B}$ – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
$^{a, b}$ - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

4.1.3. Parametry biologiczne plemników nasienia białego i żółtego

Wykazano występowanie istotnych i wysoko istotnych różnic statystycznych pomiędzy wartościami parametrów charakteryzujących plemniki nasienia białego i żółtego. Właściwości kinetyczne ruchu plemników takie jak TMOT, VCL czy BCF były wyższe w plemnikach z nasienia białego, natomiast VSL, STR i LIN były wyższe w przypadku plemników z nasienia żółtego. Wyższą statystycznie istotną koncentracją plemników, integralnością błon komórkowych plemników w rejonie akrosomowym, funkcjonalnością mitochondriów plemników oraz odsetkiem plemników żywych charakteryzowały się plemniki nasienia białego, a wyższym odsetkiem plemników apoptotycznych i nekrotycznych z nasienia żółtego. Aktywność SOD i GPx oraz zawartość GSH były statystycznie istotnie wyższe w przypadku plemników z nasienia żółtego **(Tabela 4.2)**.

Tabela 4.2 Parametry biologiczne plemników pochodzących z nasienia białego i żółtego. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM

Rodzaj nasienia	Białe	Żółte
TMOT [%]	68,43 ± 3,58 [a]	57,43 ± 3,91 [b]
PMOT [%]	35,22 ± 2,34	32,37 ± 3,37
VAP [µm/s]	77,68 ± 1,16	80,19 ± 1,95
VSL [µm/s]	66,55 ± 1,45 [b]	72,44 ± 2,14 [a]
VCL [µm/s]	113,07 ± 1,59 [A]	105,23 ± 2,17 [B]
ALH [µm]	3,63 ± 0,07	3,59 ± 0,11
BCF [Hz]	17,64 ± 0,67 [A]	14,25 ± 0,83 [B]
STR [%]	84,60 ± 0,87 [B]	89,37 ± 0,90 [A]
LIN [%]	62,29 ± 1,43 [B]	70,69 ± 1,69 [A]
Koncentracja plemników [x10^9]	3,51 ± 0,12 [A]	2,18 ± 0,13 [B]
Integralność błon komórkowych [%]	85,78 ± 0,82 [a]	81,58 ± 1,56 [b]
Funkcjonalność mitochondriów [%]	83,73 ± 1,02 [A]	79,01 ± 1,44 [B]
Odsetek plemników generujących NO [%]	42,65 ± 3,36	44,09 ± 3,75
Odsetek plemników żywych [%]	85,91 ± 1,01 [A]	75,66 ± 0,71 [B]
Odsetek plemników apoptotycznych [%]	12,16 ± 0,95 [B]	21,03 ±0,63 [A]
Odsetek plemników nekrotycznych [%]	1,93 ± 0,33 [B]	3,32 ± 0,27 [A]
Aktywność SOD [U/10^9 plem.]	0,42 ± 0,04 [B]	0,86 ± 0,14 [A]
Aktywność GPx [U/10^9 plem.]	99,36 ± 13,39 [b]	168,68 ± 30,11 [a]
Aktywność CAT [µM/min/10^9 plem.]	1,84 ± 0,78	5,95 ± 2,49
Zawartość GSH [µM/10^9 plem.]	85,39 ± 6,39 [B]	136,13 ± 21,69 [A]
Zawartość MDA [µM/10^9 plem.]	15,31 ± 1,87	12,71 ± 1,72

[A, B] – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
[a, b] - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

4.1.4. Współczynniki korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia i plemników pochodzących z białego i żółtego nasienia

Analizując parametry biochemiczne obu rodzajów plazm nasienia zauważono szereg istotnych statystycznie korelacji występujących pomiędzy nimi. W białych plazmach nasienia korelacje były na poziomie słabym i średnim. Zaobserwowano dodatnie korelacje pomiędzy zawartością białka całkowitego a aktywnościami ALP i SOD oraz pomiędzy zawartością MDA a aktywnością CAT i zawartością GSH. Ujemną korelację zanotowano pomiędzy aktywnością SOD a zawartością GSH **(Tabela 4.3)**. Z kolei wśród plazm nasienia z żółtych ejakulatów wykazano silne dodatnie korelacje pomiędzy aktywnością SOD a zawartością białka i aktywnością ACP. Wykazano, że dwa parametry tj. aktywność CAT oraz zawartość GSH nie są skorelowane z innymi badanymi parametrami **(Tabela 4.4)**.

Tabela 4.3 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm białego nasienia

	Zawartość białka	ACP	ALP	SOD	GPx	CAT	GSH	MDA
Zawartość białka	-	-0,10	**0,60**	**0,35**	0,15	0,00	0,10	0,04
ACP	-0,10	-	0,22	0,32	0,10	-0,04	-0,24	0,22
ALP	**0,60**	0,22	-	0,26	0,09	0,00	-0,11	0,01
SOD	**0,35**	0,32	0,26	-	-0,24	-0,17	**-0,36**	-0,04
GPx	0,15	0,10	0,09	-0,24	-	-0,27	-0,05	-0,23
CAT	0,00	-0,04	0,00	-0,17	-0,27	-	0,29	**0,38**
GSH	0,10	-0,24	-0,11	**-0,36**	-0,05	0,29	-	**0,34**
MDA	0,04	0,22	0,01	-0,04	-0,23	**0,38**	**0,34**	-

Tabela 4.4 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm żółtego nasienia

	Zawartość białka	ACP	ALP	SOD	GPx	CAT	GSH	MDA
Zawartość białka	-	**0,67**	**0,67**	**0,75**	**-0,53**	-0,30	-0,11	**0,47**
ACP	**0,67**	-	**0,70**	**0,75**	**-0,54**	-0,25	-0,09	**0,60**
ALP	**0,67**	**0,70**	-	**0,62**	-0,44	-0,41	0,10	**0,48**
SOD	**0,75**	**0,75**	**0,62**	-	**-0,69**	-0,09	-0,08	0,33
GPx	**-0,53**	**-0,54**	-0,44	**-0,69**	-	0,13	-0,29	-0,22
CAT	-0,30	-0,25	-0,41	-0,09	0,13	-	-0,37	-0,23
GSH	-0,11	-0,09	0,10	-0,08	-0,29	-0,37	-	0,01
MDA	**0,47**	**0,60**	**0,48**	0,33	-0,22	-0,23	0,01	-

W plemnikach z białego nasienia najsilniejsze dodatnie korelacje obserwowano pomiędzy STR a LIN ruchu oraz VAP a VSL. Niewiele słabsze zależności otrzymano pomiędzy VSL a LIN oraz między TMOT a PMOT **(Tabela 4.5)**. W przypadku nasienia żółtego zaobserwowano podobne zależności **(Tabela 4.6)**.

Tabela 4.5 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
TMOT	-	**0,74**	0,16	-0,12	**0,68**	**0,55**	0,04	**-0,51**	**-0,44**
PMOT	**0,74**	-	0,14	-0,05	**0,42**	0,17	0,17	**-0,29**	-0,26
VAP	0,16	0,14	-	**0,93**	0,17	-0,06	**-0,52**	**0,51**	**0,63**
VSL	-0,12	-0,05	**0,93**	-	-0,16	-0,27	**-0,61**	**0,78**	**0,86**
VCL	**0,68**	**0,42**	0,17	-0,16	-	**0,62**	**0,38**	**-0,68**	**-0,63**
ALH	**0,55**	0,17	-0,06	-0,27	**0,62**	-	0,02	**-0,48**	**-0,51**
BCF	0,04	0,17	**-0,52**	**-0,61**	**0,38**	0,02	-	**-0,62**	**-0,69**
STR	**-0,51**	**-0,29**	**0,51**	**0,78**	**-0,68**	**-0,48**	**-0,62**	-	**0,97**
LIN	**-0,44**	-0,26	**0,63**	**0,86**	**-0,63**	**-0,51**	**-0,69**	**0,97**	-

Tabela 4.6 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
TMOT	-	**0,83**	**0,45**	0,33	**0,62**	0,13	0,15	-0,17	-0,16
PMOT	**0,83**	-	0,26	0,14	**0,58**	0,15	**0,34**	-0,29	**-0,34**
VAP	**0,45**	0,26	-	**0,96**	**0,64**	-0,22	-0,06	**0,35**	**0,50**
VSL	0,33	0,14	**0,96**	-	**0,43**	**-0,38**	-0,13	**0,59**	**0,71**
VCL	**0,62**	**0,58**	**0,64**	**0,43**	-	**0,36**	0,27	**-0,38**	-0,32
ALH	0,13	0,15	-0,22	**-0,38**	**0,36**	-	0,13	**-0,61**	**-0,68**
BCF	0,15	**0,34**	-0,06	-0,13	0,27	0,13	-	-0,24	**-0,36**
STR	-0,17	-0,29	**0,35**	**0,59**	**-0,38**	**-0,61**	-0,24	-	**0,92**
LIN	-0,16	**-0,34**	**0,50**	**0,71**	-0,32	**-0,68**	**-0,36**	**0,92**	-

Odsetek plemników apoptotycznych, zarówno w ejakulatach białych jak i żółtych, był bardzo silnie skorelowany z odsetkiem plemników żywych mierzonych przy użyciu fluorochromów YO-PRO/PI. Pozostałe korelacje miały co najwyżej średnią siłę **(Tabela 4.7, Tabela 4.8)**.

Tabela 4.7 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Koncentracja plemników	-	-0,18	**-0,32**	0,15	-0,25	0,14	**0,35**
PMI	-0,18	-	0,17	**0,29**	-0,01	0,05	-0,12
MMP	**-0,32**	0,17	-	0,06	0,19	-0,18	-0,06
NO	0,15	**0,29**	0,06	-	0,13	-0,20	0,16
Plemniki żywe	-0,25	-0,01	0,19	0,13	-	**-0,95**	**-0,33**
Plemniki apoptotyczne	0,14	0,05	-0,18	-0,20	**-0,95**	-	0,01
Plemniki nekrotyczne	**0,35**	-0,12	-0,06	0,16	**-0,33**	0,01	

Tabela 4.8 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Koncentracja plemników	-	0,13	0,19	-0,25	-0,06	0,00	0,15
PMI	0,13	-	**0,53**	0,04	0,24	-0,25	-0,04
MMP	0,19	**0,53**	-	-0,07	0,10	-0,12	0,03
NO	-0,25	0,04	-0,07	-	0,06	-0,15	0,18
Plemniki żywe	-0,06	0,24	0,10	0,06	-	**-0,93**	**-0,46**
Plemniki apoptotyczne	0,00	-0,25	-0,12	-0,15	**-0,93**	-	0,10
Plemniki nekrotyczne	0,15	-0,04	0,03	0,18	**-0,46**	0,10	-

Parametry biochemiczne charakteryzujące plemniki z żółtych ejakulatów nie wykazywały między sobą statystycznie istotnych korelacji. Natomiast w plemnikach z białych ejakulatów słabo skorelowane ze sobą były aktywności SOD i GPx **(Tabela 4.9, Tabela 4.10)**.

Tabela 4.9 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów

	SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
SOD	-	**0,36**	-0,15	-0,13	-0,24
GPx	**0,36**	-	0,00	0,05	-0,09
CAT	-0,15	0,00	-	-0,26	0,15
GSH	-0,13	0,05	-0,26	-	0,22
MDA	-0,24	-0,09	0,15	0,22	-

Tabela 4.10 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów

	SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
SOD	-	0,25	-0,07	-0,31	-0,30
GPx	0,25	-	0,20	-0,05	0,12
CAT	-0,07	0,20	-	0,42	-0,29
GSH	-0,31	-0,05	0,42	-	-0,06
MDA	-0,30	0,12	-0,29	-0,06	-

Analizując zależności pomiędzy właściwościami antyoksydacyjnymi plazmy nasienia ejakulatów białych i żółtych a parametrami ruchliwości plemników wykazano istnienie statystycznie istotnych korelacji między nimi. W przypadku plazm i plemników z białych ejakulatów aktywność ACP była ujemnie skorelowana z TMOT, VCL oraz ALH. Aktywność SOD jest skorelowana ujemnie z VAP i VSL. Aktywność GPx ujemnie koreluje z PMOT, a zawartość GSH wykazuje dodatnią korelację z VCL. Poza tym aktywność CAT ujemnie koreluje z VAP, VSL oraz BCF **(Tabela 4.11)**. W przypadku plazm i plemników z nasienia żółtego ujemną korelację z LIN wykazuje zawartość białka, oraz aktywności fosfataz i SOD. Poza tym oprócz powiązań z LIN aktywność ALP ujemnie koreluje z VAP, VSL i STR. Z kolei aktywność CAT koreluje dodatnio z VAP i VSL **(Tabela 4.12)**.

Tabela 4.11 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchu plemników białych ejakulatów

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	-0,31	-0,31	-0,17	-0,14	-0,10	-0,06	0,18	-0,05	-0,08
ACP	**-0,42**	-0,29	-0,08	0,04	**-0,36**	**-0,37**	0,03	0,25	0,24
ALP	-0,33	-0,17	0,03	0,11	-0,31	-0,23	0,07	0,22	0,22
SOD	-0,18	0,02	**-0,53**	**-0,43**	-0,29	-0,15	0,27	-0,15	-0,21
GPx	-0,19	**-0,44**	0,17	0,23	-0,15	-0,01	-0,20	0,28	0,27
CAT	0,24	0,29	**0,48**	**0,43**	0,14	0,17	**-0,42**	0,27	0,28
GSH	0,31	0,21	0,27	0,11	**0,40**	0,28	0,02	-0,15	-0,10
MDA	-0,15	0,00	0,16	0,17	-0,07	-0,04	0,07	0,18	0,15

Tabela 4.12 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchu plemników żółtych ejakulatów

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	-0,31	0,05	-0,33	-0,39	0,36	0,09	0,26	-0,35	**-0,50**
ACP	-0,09	0,18	-0,36	-0,40	0,32	-0,05	0,38	-0,37	**-0,49**
ALP	-0,11	-0,06	**-0,49**	**-0,58**	0,37	0,04	0,32	**-0,54**	**-0,67**
SOD	-0,25	0,14	-0,17	-0,30	0,46	0,02	0,19	-0,48	**-0,50**
GPx	-0,04	-0,39	0,26	0,34	-0,27	-0,05	-0,38	0,41	0,43
CAT	0,21	0,10	**0,53**	**0,49**	0,30	0,01	-0,15	0,29	0,29
GSH	-0,04	-0,06	0,04	0,05	-0,15	-0,22	0,38	0,06	0,14
MDA	-0,01	0,24	-0,25	-0,22	0,29	-0,19	0,40	-0,02	-0,27

Koncentracja plemników w białych ejakulatach koreluje z aktywnością SOD i CAT w plazmie nasienia. Odsetek plemników generujących NO koreluje z aktywnością ACP, a odsetek plemników nekrotycznych z aktywnością SOD w plazmie **(Tabela 4.13)**. Odsetek plemników nekrotycznych w nasieniu żółtym był skorelowany z zawartością białka całkowitego, zawartością MDA oraz aktywnością fosfataz, SOD i GPx. Natomiast odsetek plemników apoptotycznych korelował z zawartością białka całkowitego i GSH. Wykazano również zależności pomiędzy PMI a zawartością GSH oraz MMP a aktywnością GPx. Plemniki generujące NO umiarkowanie ujemnie korelują z zawartością białka całkowitego oraz silnie z aktywnościami ACP i SOD **(Tabela 4.14)**.

Tabela 4.13 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Zawartość białka	-0,26	0,02	-0,09	0,03	0,22	-0,19	-0,15
ACP	0,03	-0,24	-0,14	**-0,51**	-0,10	0,13	-0,13
ALP	0,02	0,02	0,03	0,05	0,18	-0,18	0,00
SOD	**-0,35**	-0,08	-0,22	-0,27	0,33	-0,21	**-0,44**
GPx	0,09	0,08	-0,01	0,20	-0,20	0,14	0,25
CAT	**0,46**	0,18	0,05	0,17	-0,06	0,01	0,21
GSH	0,29	0,27	0,16	0,10	-0,14	0,10	0,18
MDA	0,21	-0,18	-0,05	0,01	0,14	-0,14	-0,04

Tabela 4.14 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Zawartość białka	-0,31	-0,05	-0,27	**-0,58**	-0,24	**0,50**	**-0,53**
ACP	-0,24	-0,03	-0,35	**-0,75**	0,24	0,11	**-0,69**
ALP	-0,15	-0,23	-0,26	-0,47	-0,09	0,40	**-0,65**
SOD	-0,21	-0,16	-0,40	**-0,75**	-0,11	0,36	**-0,53**
GPx	0,47	0,15	**0,49**	0,38	0,10	-0,38	**0,58**
CAT	0,34	0,28	-0,02	0,09	0,02	-0,25	0,46
GSH	-0,33	**-0,53**	0,05	0,31	-0,40	**0,54**	-0,32
MDA	-0,26	-0,24	0,10	-0,43	0,31	0,03	**-0,67**

Porównano również zależności pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm oraz plemników obydwu rodzajów nasienia. Aktywność SOD w plazmie nasienia białego korelowała z aktywnością CAT oraz zawartością GSH w plemnikach. Wykazano również, że aktywność ACP jest ujemnie skorelowana z aktywnością SOD, a ALP dodatnio z aktywnością GPx plemników z nasienia białego **(Tabela 4.15)**. W przypadku plazm i plemników z żółtych ejakulatów zauważono zależności między zawartością MDA w plemnikach a zawartością białka oraz aktywnością ALP w plazmie nasienia. Aktywność SOD w plemnikach skorelowana jest z aktywnością SOD i GPx w plazmie nasienia. Wykazano też korelację między zawartością GSH w plazmie nasienia a zawartością GSH w plemnikach **(Tabela 4.16)**.

Tabela 4.15 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów

	SOD	GPx	CAT	GSH	MDA
Zawartość białka	0,31	0,21	-0,21	0,08	-0,21
ACP	**-0,38**	-0,13	-0,08	0,20	0,01
ALP	0,17	**0,35**	-0,16	0,32	-0,05
SOD	0,03	0,08	**-0,41**	**0,35**	-0,07
GPx	0,18	-0,17	0,16	-0,16	-0,16
CAT	-0,23	-0,16	0,17	-0,07	0,25
GSH	-0,09	0,00	0,19	-0,17	0,05
MDA	-0,03	-0,18	0,09	-0,21	0,13

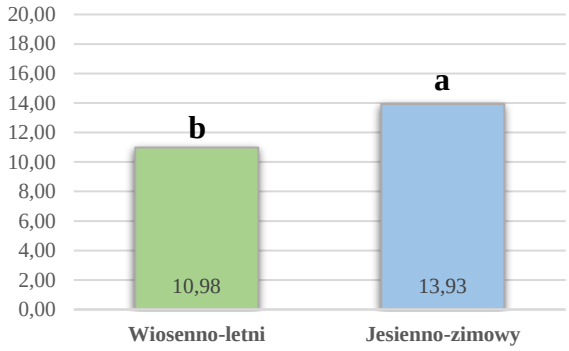
Tabela 4.16 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów

	SOD	GPx	CAT	GSH	MDA
Zawartość białka	-0,18	0,09	0,05	0,17	**-0,54**
ACP	-0,36	-0,24	0,27	0,13	-0,48
ALP	-0,31	-0,30	0,02	-0,05	**-0,50**
SOD	**-0,65**	-0,17	0,08	0,29	-0,36
GPx	**0,59**	-0,30	-0,35	-0,20	0,15
CAT	-0,26	-0,21	-0,11	-0,03	0,22
GSH	-0,23	0,13	0,24	**0,53**	0,23
MDA	-0,13	0,03	0,33	0,20	-0,32

4.2. Analiza parametrów biologicznych plazm i plemników indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

4.2.1. Zawartość białka całkowitego w plazmach nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

Średnia zawartość białka całkowitego w plazmach nasienia indorów podczas obu wyodrębnionych sezonów różniła się istotnie statystycznie ($p \leq 0,05$). W sezonie wiosenno-letnim wynosiła ona 10,98 mg/ml, a w jesienno-zimowym 13,93 mg/ml **(Wykres 4.2)**.



A, B – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
a, b - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

Wykres 4.2 Zawartość białka całkowitego plazm nasienia w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

4.2.2. Parametry biochemiczne plazm nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

W sezonie wiosenno-letnim wyższą aktywnością odznaczały się GPx i CAT oraz zawartość GSH. Z kolei w sezonie jesienno-zimowym wyższą aktywność wykazywały ACP i SOD **(Tabela 4.17)**.

Tabela 4.17 Parametry biochemiczne plazm nasienia w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM

Sezon	Wiosenno-letni	Jesienno-zimowy
Aktywność ACP [U]	4 729,17 ± 823,17 ^{b}	9 924,46 ± 1 391,01 ^{a}
Aktywność ALP [U]	41,74 ± 5,61	42,47 ± 4,84
Aktywność SOD [U/ml]	1,04 ± 0,13 ^{B}	2,52 ± 0,09 ^{A}
Aktywność GPx [U/ml]	0,68 ± 0,08 ^{A}	0,38 ± 0,02 ^{B}
Aktywność CAT [µM/min/ml]	46,73 ± 11,39 ^{A}	20,95 ± 2,65 ^{B}
Zawartość GSH [µM]	633,68 ± 56,74 ^{a}	464,68 ± 34,90 ^{b}
Zawartość MDA [µM]	14,84 ± 2,19	12,85 ± 1,78

$^{A, B}$ – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
$^{a, b}$ - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

4.2.3. Parametry biologiczne plemników w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

W sezonie wiosenno-letnim statystycznie istotnie wyższe wartości charakteryzowały VAP, VSL, STR oraz LIN, a w jesienno-zimowym BCF. Odsetki plemników generujących NO, apoptotycznych i nekrotycznych były wyższe w sezonie wiosenno-letnim. Wyższą

aktywnością enzymatyczną odznaczały się SOD i CAT w sezonie wiosenno-letnim **(Tabela 4.18)**.

Tabela 4.18 Parametry biologiczne plemników w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM

Sezon	Wiosenno-letni	Jesienno-zimowy
TMOT [%]	66,51 ± 3,35	61,20 ± 4,45
PMOT [%]	33,54 ± 2,95	34,83 ± 2,35
VAP [µm/s]	83,00 ± 1,55 ^{A}	73,22 ± 0,64 ^{B}
VSL [µm/s]	75,14 ± 1,63 ^{A}	60,96 ± 0,97 ^{B}
VCL [µm/s]	108,02 ± 1,89	112,79 ± 1,81
ALH [µm]	3,56 ± 0,08	3,69 ± 0,09
BCF [Hz]	13,96 ± 0,65 ^{B}	19,29 ± 0,69 ^{A}
STR [%]	89,88 ± 0,66 ^{A}	82,18 ± 0,92 ^{B}
LIN [%]	71,56 ± 1,29 ^{A}	58,05 ± 1,35 ^{B}
Koncentracja plemników [x10^{9}]	3,00 ± 0,18	2,99 ± 0,12
Integralność błon komórkowych [%]	84,44 ± 1,12	83,78 ± 1,19
Funkcjonalność mitochondriów [%]	82,31 ± 1,17	81,38 ± 1,31
Odsetek plemników generujących NO [%]	52,28 ± 2,82 ^{A}	31,88 ± 3,73 ^{B}
Odsetek plemników żywych [%]	79,01 ± 0,77 ^{B}	85,55 ± 1,50 ^{A}
Odsetek plemników apoptotycznych [%]	17,28 ± 0,76 ^{a}	13,52 ± 1,41 ^{b}
Odsetek plemników nekrotycznych [%]	3,70 ± 0,30 ^{A}	0,93 ± 0,20 ^{B}
Aktywność SOD [U/10^{9} plem.]	0,82 ± 0,16 ^{A}	0,46 ± 0,04 ^{B}
Aktywność GPx [U/10^{9} plem.]	122,14 ± 28,46	122,62 ± 16,08
Aktywność CAT [µM/min/10^{9} plem.]	6,27 ± 2,65 ^{a}	1,81 ± 0,74 ^{b}
Zawartość GSH [µM/10^{9} plem.]	96,78 ± 21,39	104,83 ± 8,81
Zawartość MDA [µM/10^{9} plem.]	17,25 ± 3,11	13,16 ± 1,40

$^{A, B}$ – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
$^{a, b}$ - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

4.2.4. Współczynniki korelacji wybranych parametrów biochemicznych plazm i plemników w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

W sezonie wiosenno-letnim zaobserwowano silne dodatnie korelacje pomiędzy zawartością białka i aktywnością ALP oraz pomiędzy zawartością MDA a aktywnością ACP. Oprócz tego zaobserwowano zależności między aktywnościami ALP, ACP i GPx, między SOD a CAT i zawartością MDA oraz między aktywnością GPx a zawartością białka całkowitego w plazmie nasienia **(Tabela 4.19)**. Z kolei w sezonie jesienno-zimowym obserwowano dodatnio skorelowane zawartość białka z aktywnością ALP. Ponadto, średnia zawartość białka całkowitego w plazmie była skorelowana z aktywnością GPx oraz zawartością GSH i MDA. Aktywności fosfataz są dodatnio skorelowane. Dodatkowo aktywność każdej z nich korelowała z aktywnością GPx i zawartością MDA. Aktywność ALP znacznie silniej korelowała z zawartością GSH niż aktywnością ACP. Ostatnią

zaobserwowaną korelacją w tej grupie zmiennych były zależności pomiędzy zawartością GSH a zawartością MDA w sezonie jesienno-zimowym **(Tabela 4.20)**.

Tabela 4.19 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia w sezonie wiosenno-letnim

	Zawartość białka	**ACP**	**ALP**	**SOD**	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Zawartość białka	-	0,42	**0,82**	-0,02	**0,68**	-0,17	0,15	0,20
ACP	0,42	-	**0,59**	0,24	-0,03	-0,16	0,11	**0,71**
ALP	**0,82**	**0,59**	-	0,09	**0,59**	-0,24	0,09	0,28
SOD	-0,02	0,24	0,09	-	-0,32	**0,56**	0,00	**0,53**
GPx	**0,68**	-0,03	**0,59**	-0,32	-	-0,38	-0,20	-0,38
CAT	-0,17	-0,16	-0,24	**0,56**	-0,38	-	-0,19	0,17
GSH	0,15	0,11	0,09	0,00	-0,20	-0,19	-	0,42
MDA	0,20	**0,71**	0,28	**0,53**	-0,38	0,17	0,42	-

Tabela 4.20 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia w sezonie jesienno-zimowym

	Zawartość białka	**ACP**	**ALP**	**SOD**	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Zawartość białka	-	0,30	**0,89**	0,25	**0,43**	0,09	**0,54**	**0,42**
ACP	0,30	-	**0,46**	0,27	**0,46**	0,11	0,07	**0,42**
ALP	**0,89**	**0,46**	-	0,17	**0,41**	0,01	**0,49**	**0,41**
SOD	0,25	0,27	0,17	-	0,29	0,08	-0,12	0,01
GPx	**0,43**	**0,46**	**0,41**	0,29	-	-0,21	0,06	0,26
CAT	0,09	0,11	0,01	0,08	-0,21	-	0,06	0,22
GSH	**0,54**	0,07	**0,49**	-0,12	0,06	0,06	-	**0,36**
MDA	**0,42**	**0,42**	**0,41**	0,01	0,26	0,22	**0,36**	-

W sezonie wiosenno-letnim najsilniejsze korelacje zauważono między VSL i VAP oraz między LIN a STR. Odsetek plemników ruchliwych korelował silnie dodatnio z PMOT oraz VCL. Pozostałe korelacje miały umiarkowane wartości **(Tabela 4.21)**. Podczas sezonu jesienno-zimowego, podobnie jak w sezonie wiosenno-letnim, bardzo silną korelację zaobserwowano pomiędzy STR i LIN oraz silne pomiędzy TMOT a PMOT, a także pomiędzy VSL a VAP, STR i LIN. Silne korelacje występowały również pomiędzy VCL a wartościami parametrów STR i LIN plemników **(Tabela 4.22)**.

Tabela 4.21 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchu plemników w sezonie wiosenno-letnim

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
TMOT	-	**0,82**	**0,37**	0,14	**0,77**	**0,37**	**0,32**	**-0,60**	**-0,52**
PMOT	**0,82**	-	0,28	0,11	**0,63**	0,14	**0,47**	**-0,46**	**-0,44**
VAP	**0,37**	0,28	-	**0,95**	**0,68**	-0,06	-0,16	0,21	**0,40**
VSL	0,14	0,11	**0,95**	-	**0,44**	-0,21	**-0,29**	**0,49**	**0,64**
VCL	**0,77**	**0,63**	**0,68**	**0,44**	-	**0,38**	**0,28**	**-0,51**	**-0,39**
ALH	**0,37**	0,14	-0,06	-0,21	**0,38**	-	0,05	**-0,42**	**-0,55**
BCF	**0,32**	**0,47**	-0,16	**-0,29**	**0,28**	0,05	-	**-0,55**	**-0,55**
STR	**-0,60**	**-0,46**	0,21	**0,49**	**-0,51**	**-0,42**	**-0,55**	-	**0,94**
LIN	**-0,52**	**-0,44**	**0,40**	**0,64**	**-0,39**	**-0,55**	**-0,55**	**0,94**	-

Tabela 4.22 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchu plemników w sezonie jesienno-zimowym

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
TMOT	-	**0,75**	-0,06	**-0,51**	**0,66**	**0,41**	0,13	**-0,67**	**-0,65**
PMOT	**0,75**	-	0,07	-0,15	0,22	0,20	-0,10	-0,20	-0,19
VAP	-0,06	0,07	-	**0,79**	-0,04	-0,28	0,05	**0,34**	**0,47**
VSL	**-0,51**	-0,15	**0,79**	-	**-0,54**	**-0,61**	-0,04	**0,83**	**0,88**
VCL	**0,66**	0,22	-0,04	**-0,54**	-	**0,62**	**0,48**	**-0,80**	**-0,87**
ALH	**0,41**	0,20	-0,28	**-0,61**	**0,62**	-	-0,02	**-0,66**	**-0,69**
BCF	0,13	-0,10	0,05	-0,04	**0,48**	-0,02	-	-0,15	-0,31
STR	**-0,67**	-0,20	**0,34**	**0,83**	**-0,80**	**-0,66**	-0,15	-	**0,95**
LIN	**-0,65**	-0,19	**0,47**	**0,88**	**-0,87**	**-0,69**	-0,31	**0,95**	-

Odsetek plemników apoptotycznych był silnie ujemnie skorelowany z odsetkiem plemników żywych w obu sezonach. Poza tym występowały liczne słabe i umiarkowane zależności pomiędzy parametrami biologicznymi charakteryzującymi plemniki **(Tabela 4.23, Tabela 4.24)**. W sezonie wiosenno-letnim koncentracja plemników korelowała z odsetkiem plemników apoptotycznych oraz żywych. PMI była skorelowana z odsetkiem plemników żywych oraz MMP, która z kolei miała wpływ na odsetek plemników generujących NO **(Tabela 4.23)**. Podczas sezonu jesienno-zimowego odsetek plemników nekrotycznych był skorelowany z odsetkiem plemników apoptotycznych i żywych **(Tabela 4.24)**.

Tabela 4.23 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Koncentracja plemników	-	0,11	0,15	0,12	**0,35**	**-0,41**	0,13
PMI	0,11	-	**0,56**	0,10	**0,35**	-0,25	-0,27
MMP	0,15	**0,56**	-	**-0,33**	0,28	-0,21	-0,18
NO	0,12	0,10	**-0,33**	-	0,14	-0,07	-0,18
Plemniki żywe	**0,35**	**0,35**	0,28	0,14	-	**-0,92**	-0,20
Plemniki apoptotyczne	**-0,41**	-0,25	-0,21	-0,07	**-0,92**	-	-0,19
Plemniki nekrotyczne	0,13	-0,27	-0,18	-0,18	-0,20	-0,19	-

Tabela 4.24 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Koncentracja plemników	-	0,20	-0,06	-0,24	0,26	-0,24	-0,26
PMI	0,20	-	0,18	0,21	0,21	-0,20	-0,16
MMP	-0,06	0,18	-	0,30	**0,41**	**-0,41**	-0,20
NO	-0,24	0,21	0,30	-	**0,40**	**-0,41**	-0,07
Plemniki żywe	0,26	0,21	**0,41**	**0,40**	-	**-0,99**	**-0,49**
Plemniki apoptotyczne	-0,24	-0,20	**-0,41**	**-0,41**	**-0,99**	-	**0,38**
Plemniki nekrotyczne	-0,26	-0,16	-0,20	-0,07	**-0,49**	**0,38**	-

W sezonie jesienno-zimowym zaobserwowano umiarkowanie silną dodatnią korelację między aktywnościami SOD i GPx oraz silną pomiędzy aktywnością CAT i zawartością GSH w plemnikach. Natomiast w sezonie wiosenno-letnim żadna z występujących korelacji nie była statystycznie istotna **(Tabela 4.25, Tabela 4.26)**.

Tabela 4.25 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim

	SOD	GPx	CAT	GSH	MDA
SOD	-	0,48	-0,15	-0,11	-0,49
GPx	0,48	-	0,49	0,08	-0,12
CAT	-0,15	0,49	-	0,15	-0,07
GSH	-0,11	0,08	0,15	-	0,04
MDA	-0,49	-0,12	-0,07	0,04	-

Tabela 4.26 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym

	SOD	GPx	CAT	GSH	MDA
SOD	-	**0,43**	0,20	0,19	-0,15
GPx	**0,43**	-	-0,12	0,14	-0,01
CAT	0,20	-0,12	-	**0,71**	-0,23
GSH	0,19	0,14	**0,71**	-	0,03
MDA	-0,15	-0,01	-0,23	0,03	-

Analizując zależności występujące pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników zanotowano występowanie umiarkowanie silnych korelacji. Podczas sezonu wiosenno-letniego TMOT był powiązany z aktywnościami SOD oraz GPx. Aktywność drugiego wspomnianego enzymu korelowała z PMOT. Poza tym VCL skorelowana była z zawartością białka, a STR z aktywnością ACP i zawartością MDA **(Tabela 4.27)**. Znacznie więcej zależności zaobserwowano w próbach pochodzących z sezonu jesienno-zimowego. TMOT był skorelowany z zawartością białka, aktywnością fosfataz, GPx i zawartością MDA. Ponadto aktywność ACP była skorelowana z PMOT, VSL, VCL, STR i LIN. Pozostałe zależności występujące w sezonie jesienno-zimowym zaznaczono w **Tabeli 4.28.**

Tabela 4.27 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników w sezonie wiosenno-letnim

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	-0,26	-0,22	-0,43	-0,32	**-0,58**	-0,02	-0,05	0,07	0,01
ACP	0,22	0,38	-0,43	-0,48	-0,14	-0,31	0,35	**-0,51**	-0,47
ALP	-0,12	-0,16	-0,48	-0,42	-0,50	-0,09	-0,06	-0,13	-0,17
SOD	**0,59**	0,39	0,07	-0,02	0,23	0,10	-0,03	-0,33	-0,26
GPx	**-0,55**	**-0,64**	-0,31	-0,21	-0,48	0,06	-0,23	0,13	0,08
CAT	0,42	0,27	0,37	0,28	0,46	0,24	-0,24	-0,03	-0,02
GSH	-0,06	0,04	-0,07	-0,05	-0,22	-0,19	0,41	0,03	0,12
MDA	0,37	0,48	-0,26	-0,34	0,02	-0,03	0,39	**-0,51**	-0,42

Tabela 4.28 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchu plemników w sezonie jesienno-zimowym

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	**-0,42**	-0,28	0,14	0,24	-0,23	0,04	-0,25	0,23	0,25
ACP	**-0,45**	**-0,36**	0,20	**0,40**	**-0,39**	-0,25	-0,18	**0,46**	**0,50**
ALP	**-0,41**	-0,24	0,16	0,29	-0,31	-0,03	-0,23	0,29	**0,34**
SOD	-0,27	0,04	0,09	0,29	**-0,35**	-0,23	-0,03	**0,40**	**0,37**
GPx	**-0,38**	**-0,38**	0,09	0,21	-0,23	-0,13	-0,28	0,24	0,25
CAT	-0,01	0,14	0,30	0,30	-0,02	-0,01	-0,19	0,23	0,24
GSH	0,05	0,01	0,09	-0,07	0,21	0,24	-0,06	-0,18	-0,16
MDA	**-0,37**	-0,25	0,15	0,29	-0,16	-0,09	-0,04	**0,36**	0,28

W sezonie WL wykazano ujemne korelacje pomiędzy koncentracją plemników a zawartością białka i aktywnością ACP, pomiędzy PMI a zawartością GSH oraz pomiędzy odsetkiem plemników generujących NO a aktywnością ACP i zawartością MDA w plazmie nasienia **(Tabela 4.29)**. Podczas sezonu jesienno-zimowego zarówno zawartość białka jak i aktywność ALP w plazmie były skorelowane z koncentracją plemników. Aktywność ALP wydawała się być powiązana z odsetkiem plemników generujących NO oraz odsetkiem plemników żywych i apoptotycznych. Z kolei zawartość GSH w plazmach skorelowana była z liczbą plemników żywych i apoptotycznych, a zawartość MDA z PMI **(Tabela 4.30)**.

Tabela 4.29 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim

	Koncentracja plemników	**PMI**	**MMP**	**NO**	**Plemniki żywe**	**Plemniki apoptotyczne**	**Plemniki nekrotyczne**
Zawartość białka	**-0,56**	-0,15	0,13	-0,16	-0,40	0,30	0,14
ACP	**-0,50**	0,10	0,33	**-0,54**	-0,09	0,24	-0,39
ALP	-0,42	-0,15	-0,05	-0,09	-0,37	0,33	-0,01
SOD	0,25	0,02	-0,08	-0,13	0,41	-0,24	-0,27
GPx	-0,21	0,02	-0,02	0,20	-0,47	0,31	0,25
CAT	0,39	0,25	0,08	-0,25	0,30	-0,29	0,06
GSH	-0,19	**-0,69**	-0,09	0,06	-0,17	0,23	-0,20
MDA	-0,15	-0,09	0,39	**-0,62**	0,09	0,09	-0,39

Tabela 4.30 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym

	Koncentracja plemników	**PMI**	**MMP**	**NO**	**Plemniki żywe**	**Plemniki apoptotyczne**	**Plemniki nekrotyczne**
Zawartość białka	**-0,53**	-0,26	-0,29	-0,13	**-0,51**	**0,48**	**0,43**
ACP	-0,04	-0,28	-0,26	**-0,53**	**-0,38**	**0,37**	0,24
ALP	**-0,42**	-0,32	-0,19	-0,16	**-0,51**	**0,47**	**0,50**
SOD	-0,12	-0,03	-0,17	-0,18	-0,01	0,00	0,12
GPx	-0,25	-0,25	0,01	-0,30	-0,24	0,24	0,15
CAT	-0,01	0,20	-0,26	0,21	-0,05	0,05	0,06
GSH	-0,30	0,01	0,00	-0,04	**-0,40**	**0,39**	0,28
MDA	-0,16	**-0,35**	-0,20	-0,07	-0,12	0,12	0,09

Dla sezonu wiosenno-letniego charakterystyczne były zależności występujące pomiędzy aktywnością SOD w plemnikach a zawartością białka oraz aktywnością ALP, GPx i CAT w plazmach nasienia. Zawartości GSH w plazmie i plemnikach były ze sobą umiarkowanie skorelowane **(Tabela 4.31)**. Natomiast w sezonie jesienno-zimowym wykazano dodatnie korelacje pomiędzy aktywnością CAT oraz zawartością GSH w plemnikach a zawartością białka całkowitego oraz aktywnościami obu fosfataz w plazmie

nasienia. Oprócz tego w omawianym płynie aktywność CAT w plemnikach skorelowana była z zawartością GSH. Ponadto wykazano zależności pomiędzy zawartościami MDA i GSH oraz aktywnością SOD w plemnikach a zawartością białka całkowitego w plazmach nasienia **(Tabela 4.32)**.

Tabela 4.31 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim

		Plemniki				
		SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Plazma	**Zawartość białka**	**0,68**	0,42	0,03	0,36	-0,33
	ACP	0,41	0,41	0,43	0,09	-0,17
	ALP	**0,60**	0,22	-0,04	0,18	-0,20
	SOD	-0,37	-0,30	0,08	0,37	0,38
	GPx	**0,60**	-0,01	-0,33	0,03	-0,41
	CAT	**-0,51**	-0,45	-0,11	0,03	0,27
	GSH	-0,08	0,35	0,05	**0,54**	0,49
	MDA	0,10	0,29	0,34	0,35	0,33

Tabela 4.32 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym

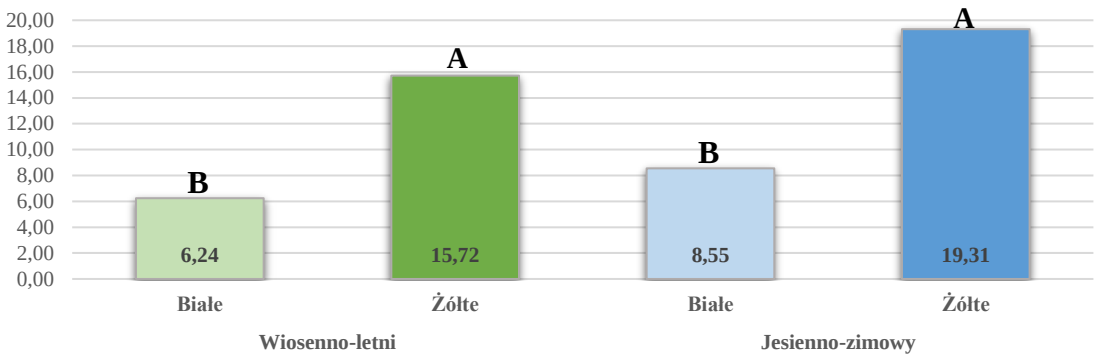
		Plemniki				
		SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Plazma	**Zawartość białka**	**0,42**	0,33	**0,41**	**0,41**	-0,23
	ACP	-0,23	-0,16	**0,38**	**0,35**	-0,09
	ALP	0,30	0,30	**0,47**	**0,48**	-0,23
	SOD	0,18	-0,06	0,09	0,15	-0,12
	GPx	0,15	-0,08	0,07	0,27	0,00
	CAT	0,04	0,24	-0,07	-0,06	-0,05
	GSH	0,09	0,14	**0,47**	0,25	**-0,40**
	MDA	0,13	-0,05	0,26	0,05	-0,23

4.3. Analiza parametrów biologicznych plazm i plemników z nasienia białego i żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

4.3.1. Zawartość białka całkowitego w plazmach białego i żółtego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

Zarówno w sezonie wiosenno-letnim jak i jesienno-zimowym średnia zawartość białka w plazmie nasienia indorów z YSS była ponad dwukrotnie wyższa od zawartości białka w plazmach białych. Wykazano statystycznie istotnie wyższą zawartość białka całkowitego w plazmach w sezonie jesienno-zimowym bez względu na rodzaj nasienia. W sezonie wiosenno-letnim średnia zawartość białka w plazmie dla nasienia białego

wynosiła 6,24 mg/ml a dla nasienia z YSS 15,72 mg/ml. Natomiast w sezonie jesienno-zimowym odpowiednio 8,55 mg/ml i 19,31 mg/ml **(Wykres 4.3)**.



A, B – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
a, b - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

Wykres 4.3 Zawartość białka całkowitego w plazmach z białego i żółtego nasienia w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

4.3.2. Parametry biochemiczne plazm z białego i żółtego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

W sezonie wiosenno-letnim plazmy nasienia żółtego charakteryzowały się wyższymi aktywnościami ALP i GPx, natomiast w sezonie jesienno-zimowym aktywnością fosfataz, GPx oraz zawartościami GSH i MDA w stosunku do plazm z nasienia białego z tego samego okresu **(Tabela 4.33)**.

Tabela 4.33 Parametry biochemiczne plazm z białego i żółtego nasienia w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM

Sezon	**Wiosenno-letni**		**Jesienno-zimowy**	
Rodzaj nasienia	**Białe**	**Żółte**	**Białe**	**Żółte**
Aktywność ACP [U]	3 454,33 ± 788,49	6 004,01 ± 1 348,32	7 842,88 ± 1 577,19 ^{B}	16 169,20 ± 1 927,42 ^{A}
Aktywność ALP [U]	23,55 ± 2,11 ^{B}	59,94 ± 5,97 ^{A}	27,34 ± 2,88 ^{B}	87,83 ± 4,54 ^{A}
Aktywność SOD [U/ml]	1,06 ± 0,21	1,03 ± 0,17	2,49 ± 0,11	2,61 ± 0,11
Aktywność GPx [U/ml]	0,48 ± 0,09 ^{B}	0,89 ± 0,10 ^{A}	0,36 ± 0,02 ^{b}	0,46 ± 0,04 ^{a}
Aktywność CAT [µM/min/ml]	55,60 ± 15,68	37,87 ± 16,96	20,19 ± 3,17	23,24 ± 4,88
Zawartość GSH [µM]	594,28 ± 76,00	673,09 ± 87,05	396,10 ± 35,02 ^{B}	670,43 ± 54,59 ^{A}
Zawartość MDA [µM]	13,51 ± 3,81	16,17 ± 2,36	10,10 ± 1,90 ^{B}	21,11 ± 3,17 ^{A}

$^{A, B}$ – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
$^{a, b}$ - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

4.3.3. Wybrane parametry biologiczne plemników pochodzących z nasienia białego i żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

W sezonie wiosenno-letnim w ejakulatach pozyskanych od indorów z YSS wyższymi wartościami charakteryzowały się STR i LIN. Z kolei w sezonie jesienno-zimowym plemniki z nasienia białego odznaczały się wyższymi wartościami TMOT i BCF. Koncentracja oraz odsetek plemników żywych mierzonych za pomocą YO-PRO/PI były istotnie wyższe w plemnikach z nasienia białego zarówno w sezonie wiosenno-letnim jak i jesienno-zimowym. Odwrotną zależność można było zauważyć w odsetku plemników apoptotycznych, którego wyższe poziomy notowano w plemnikach pochodzących z żółtych ejakulatów obydwu sezonów. Plemniki z białego i żółtego nasienia różniły się statystycznie istotnie pod względem integralności błon komórkowych w rejonie akrosomowym w sezonie jesienno-zimowym oraz funkcjonalności mitochondriów w sezonie wiosenno-letnim. W obydwu przypadkach omawiane parametry biochemiczne plemników z białych ejakulatów były wyższe. Liczba plemników nekrotycznych różniła się statystycznie wysoko istotnie pomiędzy plemnikami z białego i żółtego nasienia w sezonie jesienno-zimowym, z przewagą dla plemników od indorów z YSS. Ponadto wykazano statystycznie istotne różnice w aktywności SOD w okresie wiosenno-letnim i CAT w okresie jesienno-zimowym pomiędzy dwiema grupami plemników. W obydwu przypadkach aktywność enzymów antyoksydacyjnych była wyższa w plemnikach pochodzących z żółtych ejakulatów **(Tabela 4.34)**.

Tabela 4.34 Parametry biologiczne plemników pochodzących z nasienia białego i żółtego w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM

Sezon	Wiosenno-letni		Jesienno-zimowy	
Rodzaj nasienia	**Białe**	**Żółte**	**Białe**	**Żółte**
TMOT [%]	70,98 ± 4,60	62,04 ± 4,79	66,30 ± 5,38 ^{a}	45,90 ± 5,37 ^{b}
PMOT [%]	34,20 ± 3,76	32,88 ± 4,62	36,08 ± 2,98	31,08 ± 2,79
VAP [µm/s]	83,41 ± 1,81	82,60 ± 2,56	72,90 ± 0,77	74,17 ± 1,11
VSL [µm/s]	74,17 ± 2,05	76,12 ± 2,56	60,20 ± 1,09	63,25 ± 2,02
VCL [µm/s]	111,57 ± 2,20	104,48 ± 2,95	114,33 ± 2,27	108,16 ± 1,87
ALH [µm]	3,63 ± 0,10	3,48 ± 0,13	3,63 ± 0,09	3,86 ± 0,22
BCF [Hz]	14,60 ± 0,99	13,31 ± 0,83	20,18 ± 0,61 ^{a}	16,62 ± 1,90 ^{b}
STR [%]	88,32 ± 1,02 ^{b}	91,44 ± 0,74 ^{a}	81,50 ± 0,11	84,20 ± 1,73
LIN [%]	68,88 ± 1,72 ^{b}	74,24 ±1,80 ^{a}	56,80 ± 1,63	61,80 ± 1,99
Koncentracja plemników [x10^{9}]	3,88 ± 0,20 ^{A}	2,12 ± 0,17 ^{B}	3,20 ± 0,12 ^{A}	2,34 ± 0,20 ^{B}
Integralność błon komórkowych [%]	86,43 ± 1,09	82,45 ± 1,90	85,23 ± 1,21 ^{a}	79,40 ± 2,73 ^{b}
Funkcjonalność mitochondriów [%]	84,81 ± 1,30 ^{a}	79,81 ± 1,84 ^{b}	82,83 ± 1,53	77,00 ± 2,07
Odsetek plemników generujących NO [%]	53,32 ± 4,09	51,25 ± 3,96	33,77 ± 4,59	26,20 ± 5,67
Odsetek plemników żywych [%]	82,02 ± 0,96 ^{A}	76,01 ± 0,85 ^{B}	89,14 ± 1,44 ^{A}	74,78 ± 1,31 ^{B}
Odsetek plemników apoptotycznych [%]	14,29 ± 1,06 ^{B}	20,26 ± 0,71 ^{A}	10,38 ± 1,44 ^{B}	22,95 ± 1,17 ^{A}
Odsetek plemników nekrotycznych [%]	3,67 ± 0,52	3,73 ± 0,31	0,48 ± 0,17 ^{B}	2,27 ± 0,35 ^{A}
Aktywność SOD [U/10^{9} plem.]	0,43 ± 0,08 ^{b}	1,20 ± 0,25 ^{a}	0,42 ± 0,05	0,57 ± 0,06
Aktywność GPx [U/10^{9} plem.]	72,58 ± 13,28	171,71 ± 50,92	107,60 ± 16,81	166,00 ± 37,52
Aktywność CAT [µM/min/10^{9} plem.]	5,64 ± 3,05	6,90 ± 4,56	0,67 ± 0,11 ^{B}	5,10 ± 2,65 ^{A}
Zawartość GSH [µM/10^{9} plem.]	67,29 ± 14,52	126,27 ± 38,75	90,96 ± 6,85	144,89 ± 24,27
Zawartość MDA [µM/10^{9} plem.]	19,77 ± 5,39	14,73 ± 3,24	13,94 ± 1,80	10,92 ± 1,49

$^{A, B}$ – Różnice statystycznie wysoko istotne ($p \leq 0,01$)
$^{a, b}$ - Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$)

4.3.4. Współczynniki korelacji dla wybranych parametrów plazm nasienia i plemników pochodzących z białego i żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

Plazmy z nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim cechowały dodatnie zależności pomiędzy zawartością MDA a aktywnością ACP oraz zawartością GSH. Natomiast silna ujemna korelacja występowała pomiędzy aktywnością GPx a zawartością MDA **(Tabela 4.35)**. W plazmach żółtego nasienia wykazano również silną dodatnią korelację pomiędzy zawartością MDA a aktywnością ACP **(Tabela 4.36)**. W sezonie

jesienno-zimowym występowały jedynie słabe lub umiarkowane korelacje. W plazmach nasienia białego wykazano zależności pomiędzy aktywnością ALP i zawartością białka całkowitego oraz między aktywnością ACP a aktywnością GPx **(Tabela 4.37)**. Natomiast w plazmach nasienia żółtego podczas sezonu jesienno-zimowego skorelowane były między sobą aktywność ALP i zawartość GSH **(Tabela 4.38)**.

Tabela 4.35 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim

	Zawartość białka	**ACP**	**ALP**	**SOD**	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Zawartość białka	-	-0,19	0,20	0,04	0,22	0,33	0,29	-0,02
ACP	-0,19	-	0,09	0,00	-0,66	0,17	0,69	**0,76**
ALP	0,20	0,09	-	0,64	-0,53	0,62	0,37	0,48
SOD	0,04	0,00	0,64	-	-0,47	0,70	0,08	0,55
GPx	0,22	-0,66	-0,53	-0,47	-	-0,69	-0,45	**-0,86**
CAT	0,33	0,17	0,62	0,70	-0,69	-	0,16	0,59
GSH	0,29	0,69	0,37	0,08	-0,45	0,16	-	**0,74**
MDA	-0,02	**0,76**	0,48	0,55	**-0,86**	0,59	**0,74**	-

Tabela 4.36 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia żółtego w sezonie wiosenno-letnim

	Zawartość białka	**ACP**	**ALP**	**SOD**	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Zawartość białka	-	0,46	0,33	-0,03	0,43	-0,39	-0,48	0,56
ACP	0,46	-	0,61	0,50	-0,27	-0,23	-0,29	**0,85**
ALP	0,33	0,61	-	0,10	0,36	-0,39	-0,27	0,28
SOD	-0,03	0,50	0,10	-	-0,33	0,41	-0,07	0,52
GPx	0,43	-0,27	0,36	-0,33	-	-0,04	-0,40	-0,37
CAT	-0,39	-0,23	-0,39	0,41	-0,04	-	-0,41	-0,33
GSH	-0,48	-0,29	-0,27	-0,07	-0,40	-0,41	-	-0,02
MDA	0,56	**0,85**	0,28	0,52	-0,37	-0,33	-0,02	-

Tabela 4.37 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia białego w sezonie jesienno-zimowym

	Zawartość białka	**ACP**	**ALP**	**SOD**	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Zawartość białka	-	-0,14	**0,62**	0,36	0,27	0,04	0,17	0,09
ACP	-0,14	-	0,21	0,26	**0,40**	0,12	-0,24	0,25
ALP	**0,62**	0,21	-	0,24	0,34	-0,03	-0,12	-0,02
SOD	0,36	0,26	0,24	-	0,24	0,13	-0,19	-0,03
GPx	0,27	**0,40**	0,34	0,24	-	-0,31	-0,06	0,01
CAT	0,04	0,12	-0,03	0,13	-0,31	-	0,11	0,27
GSH	0,17	-0,24	-0,12	-0,19	-0,06	0,11	-	0,20
MDA	0,09	0,25	-0,02	-0,03	0,01	0,27	0,20	-

Tabela 4.38 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia żółtego w sezonie jesienno-zimowym

	Zawartość białka	**ACP**	**ALP**	**SOD**	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Zawartość białka	-	0,04	0,16	0,00	-0,12	0,21	0,17	0,39
ACP	0,04	-	0,33	0,31	0,24	-0,10	-0,02	0,51
ALP	0,16	0,33	-	-0,15	-0,32	-0,44	**0,69**	0,51
SOD	0,00	0,31	-0,15	-	0,49	-0,27	-0,31	-0,06
GPx	-0,12	0,24	-0,32	0,49	-	-0,11	-0,58	0,40
CAT	0,21	-0,10	-0,44	-0,27	-0,11	-	-0,36	-0,05
GSH	0,17	-0,02	**0,69**	-0,31	-0,58	-0,36	-	0,04
MDA	0,39	0,51	0,51	-0,06	0,40	-0,05	0,04	-

W obu sezonach, niezależnie od rodzaju nasienia, zaobserwowano silne korelacje pomiędzy TMOT a PMOT i bardzo silne korelacje pomiędzy parametrami LIN a STR oraz VSL a VAP z wyjątkiem plemników nasienia białego z sezonu jesienno-zimowego, gdzie korelacja była słabsza **(Tabela 4.39, Tabela 4.40, Tabela 4.41, Tabela 4.42)**. Charakterystyczną zależnością dla gamet w sezonie wiosenno-letnim była korelacja między TMOT a VCL **(Tabela 4.39, Tabela 4.40)**. Dla sezonu jesienno-zimowego była to korelacja pomiędzy VSL a STR z tym, że w nasieniu białym korelacje były silne, a w żółtych bardzo silne **(Tabela 4.41, Tabela 4.42)**. Plemniki pochodzące z białego nasienia charakteryzowały się zależnością pomiędzy VSL a LIN **(Tabela 4.39, Tabela 4.41)**. Plemniki z nasienia pochodzącego od indorów z YSS z sezonu WL wykazywały specyficzną zależność pomiędzy VCL a VAP **(Tabela 4.40)**. Najwięcej specyficznych korelacji wykazywały plemniki z nasienia białego i sezonu JZ, gdzie BCF powiązane było z VSL, VCL, STR i LIN. Poza tym silne zależności w wyżej wymienionym rodzaju nasienia obejmowały VCL, STR i LIN **(Tabela 4.41)**. Z kolei gamety z nasienia żółtego, pochodzące z tego samego sezonu, wykazywały korelacje między VAP a STR i LIN oraz między VSL a LIN **(Tabela 4.42)**.

Tabela 4.39 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników z białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	TMOT	**PMOT**	**VAP**	**VSL**	**VCL**	**ALH**	**BCF**	**STR**	**LIN**
TMOT	-	**0,79**	0,26	-0,04	**0,77**	**0,48**	0,24	**-0,60**	**-0,55**
PMOT	**0,79**	-	0,26	0,03	**0,69**	0,04	**0,47**	**-0,48**	**-0,43**
VAP	0,26	0,26	-	**0,93**	**0,57**	0,07	-0,37	0,36	**0,50**
VSL	-0,04	0,03	**0,93**	-	0,26	-0,10	**-0,50**	**0,66**	**0,77**
VCL	**0,77**	**0,69**	**0,57**	0,26	-	**0,42**	0,23	**-0,50**	**-0,41**
ALH	**0,48**	0,04	0,07	-0,10	**0,42**	-	-0,21	-0,30	-0,36
BCF	0,24	**0,47**	-0,37	**-0,50**	0,23	-0,21	-	**-0,60**	**-0,63**
STR	**-0,60**	**-0,48**	0,36	**0,66**	**-0,50**	-0,30	**-0,60**	-	**0,96**
LIN	**-0,55**	**-0,43**	**0,50**	**0,77**	**-0,41**	-0,36	**-0,63**	**0,96**	-

Tabela 4.40 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
TMOT	-	**0,87**	**0,45**	0,31	**0,76**	0,25	0,38	**-0,57**	**-0,44**
PMOT	**0,87**	-	0,29	0,17	**0,62**	0,21	**0,50**	**-0,52**	**-0,47**
VAP	**0,45**	0,29	-	**0,98**	**0,77**	-0,15	-0,01	0,15	0,39
VSL	0,31	0,17	**0,98**	-	**0,62**	-0,27	-0,08	0,35	**0,57**
VCL	**0,76**	**0,62**	**0,77**	**0,62**	-	0,33	0,28	**-0,47**	-0,28
ALH	0,25	0,21	-0,15	-0,27	0,33	-	0,27	**-0,56**	**-0,68**
BCF	0,38	**0,50**	-0,01	-0,08	0,28	0,27	-	**-0,42**	**-0,44**
STR	**-0,57**	**-0,52**	0,15	0,35	**-0,47**	**-0,56**	**-0,42**	-	**0,94**
LIN	**-0,44**	**-0,47**	0,39	**0,57**	-0,28	**-0,68**	**-0,44**	**0,94**	-

Tabela 4.41 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
TMOT	-	**0,73**	0,02	**-0,50**	**0,66**	**0,61**	0,00	**-0,70**	**-0,64**
PMOT	**0,73**	-	0,15	-0,09	0,20	0,31	-0,25	-0,18	-0,15
VAP	0,02	0,15	-	**0,76**	-0,01	-0,34	-0,04	0,22	**0,39**
VSL	**-0,50**	-0,09	**0,76**	-	**-0,58**	**-0,75**	-0,18	**0,79**	**0,87**
VCL	**0,66**	0,20	-0,01	**-0,58**	-	**0,78**	**0,57**	**-0,89**	**-0,90**
ALH	**0,61**	0,31	-0,34	**-0,75**	**0,78**	-	0,33	**-0,77**	**-0,85**
BCF	0,00	-0,25	-0,04	-0,18	**0,57**	0,33	-	-0,33	**-0,47**
STR	**-0,70**	-0,18	0,22	**0,79**	**-0,89**	**-0,77**	-0,33	-	**0,95**
LIN	**-0,64**	-0,15	**0,39**	**0,87**	**-0,90**	**-0,85**	**-0,47**	**0,95**	-

Tabela 4.42 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
TMOT	-	**0,87**	-0,33	-0,44	0,34	0,22	0,06	-0,41	-0,46
PMOT	**0,87**	-	-0,32	-0,31	0,07	-0,01	0,01	-0,22	-0,24
VAP	-0,33	-0,32	-	**0,93**	-0,01	-0,28	0,46	**0,78**	**0,78**
VSL	-0,44	-0,31	**0,93**	-	-0,24	-0,54	0,41	**0,94**	**0,94**
VCL	0,34	0,07	-0,01	-0,24	-	0,60	0,25	-0,28	-0,52
ALH	0,22	-0,01	-0,28	-0,54	0,60	-	-0,31	**-0,67**	**-0,68**
BCF	0,06	0,01	0,46	0,41	0,25	-0,31	-	0,37	0,29
STR	-0,41	-0,22	**0,78**	**0,94**	-0,28	**-0,67**	0,37	-	**0,94**
LIN	-0,46	-0,24	**0,78**	**0,94**	-0,52	**-0,68**	0,29	**0,94**	-

Niezależnie od sezonu oraz rodzaju nasienia odsetek plemników apoptotycznych w nasieniu jest silnie skorelowany z odsetkiem plemników żywych **(Tabela 4.43, Tabela 4.44, Tabela 4.45, Tabela 4.46)**. W plemnikach z nasienia żółtego, pobranych w sezonie jesienno-zimowym, występowała silna ujemna korelacja pomiędzy koncentracją a odsetkiem plemników generujących NO **(Tabela 4.46)**. Występowały także korelacje na poziomie słabym lub umiarkowanym. Plemniki pochodzące z nasienia białego wykazywały korelację pomiędzy MMP a odsetkiem plemników generujących NO niezależnie od sezonu

(Tabela 4.43, Tabela 4.45). Charakterystyczne dla plemników z białego nasienia w sezonie WL były zależności pomiędzy koncentracją plemników a PMI i MMP oraz pomiędzy odsetkiem plemników nekrotycznych a PMI i odsetkiem plemników apoptotycznych **(Tabela 4.43)**. W przypadku plemników z nasienia żółtego z tego samego okresu wykazano korelacje pomiędzy MMP a PMI oraz pomiędzy odsetkami plemników żywych i nekrotycznych **(Tabela 4.44)**. W przypadku plemników białych ejakulatów z sezonu jesienno-zimowego wykazano korelacje pomiędzy MMP a odsetkami plemników żywych i apoptotycznych. Podobnie było w przypadku odsetka plemników generujących NO, gdzie wykazano korelacje z odsetkami plemników żywych i apoptotycznych. Ponadto odsetek plemników apoptotycznych i żywych były skorelowane **(Tabela 4.45)**.

Tabela 4.43 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	Koncentracja plemników	**PMI**	**MMP**	**NO**	**Plemniki żywe**	**Plemniki apoptotyczne**	**Plemniki nekrotyczne**
Koncentracja plemników	-	**-0,40**	**-0,51**	0,27	0,05	-0,12	0,16
PMI	**-0,40**	-	0,21	0,19	0,17	0,08	**-0,49**
MMP	**-0,51**	0,21	-	**-0,66**	0,07	0,09	-0,32
NO	0,27	0,19	**-0,66**	-	0,10	0,03	-0,23
Plemniki żywe	0,05	0,17	0,07	0,10	-	**-0,87**	-0,05
Plemniki apoptotyczne	-0,12	0,08	0,09	0,03	**-0,87**	-	**-0,44**
Plemniki nekrotyczne	0,16	**-0,49**	-0,32	-0,23	-0,05	**-0,44**	-

Tabela 4.44 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	Koncentracja plemników	**PMI**	**MMP**	**NO**	**Plemniki żywe**	**Plemniki apoptotyczne**	**Plemniki nekrotyczne**
Koncentracja plemników	-	0,10	0,24	-0,08	-0,20	0,11	0,30
PMI	0,10	-	**0,66**	0,04	0,33	-0,34	-0,15
MMP	0,24	**0,66**	-	-0,15	0,19	-0,20	-0,07
NO	-0,08	0,04	-0,15	-	0,18	-0,17	-0,10
Plemniki żywe	-0,20	0,33	0,19	0,18	-	**-0,94**	**-0,60**
Plemniki apoptotyczne	0,11	-0,34	-0,20	-0,17	**-0,94**	-	0,28
Plemniki nekrotyczne	0,30	-0,15	-0,07	-0,10	**-0,60**	0,28	-

Tabela 4.45 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	Koncentracja plemników	**PMI**	**MMP**	**NO**	**Plemniki żywe**	**Plemniki apoptotyczne**	**Plemniki nekrotyczne**
Koncentracja plemników	-	-0,08	-0,34	-0,28	-0,21	0,19	0,16
PMI	-0,08	-	0,13	0,32	-0,01	0,00	0,11
MMP	-0,34	0,13	-	**0,36**	**0,37**	**-0,37**	-0,05
NO	-0,28	0,32	**0,36**	-	**0,52**	**-0,52**	-0,01
Plemniki żywe	-0,21	-0,01	**0,37**	**0,52**	-	**-0,99**	-0,04
Plemniki apoptotyczne	0,19	0,00	**-0,37**	**-0,52**	**-0,99**	-	-0,07
Plemniki nekrotyczne	0,16	0,11	-0,05	-0,01	-0,04	-0,07	-

Tabela 4.46 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	Koncentracja plemników	**PMI**	**MMP**	**NO**	**Plemniki żywe**	**Plemniki apoptotyczne**	**Plemniki nekrotyczne**
Koncentracja plemników	1,00	0,37	0,06	**-0,79**	0,56	-0,59	-0,13
PMI	0,37	1,00	-0,06	-0,29	-0,12	0,12	0,03
MMP	0,06	-0,06	1,00	-0,27	-0,34	0,33	0,17
NO	**-0,79**	-0,29	-0,27	1,00	-0,57	0,60	0,13
Plemniki żywe	0,56	-0,12	-0,34	-0,57	1,00	**-0,97**	-0,52
Plemniki apoptotyczne	-0,59	0,12	0,33	0,60	**-0,97**	1,00	0,28
Plemniki nekrotyczne	-0,13	0,03	0,17	0,13	-0,52	0,28	1,00

Badając korelacje pomiędzy parametrami biochemicznymi plemników, biorąc pod uwagę zarówno wyodrębnione sezony jak i występowanie syndromu żółtego nasienia, wykazano w sezonie jesienno-zimowym silną ujemną korelację między zawartością MDA a aktywnością CAT oraz silną dodatnią korelację między zawartością GSH a aktywnością CAT w nasieniu żółtym **(Tabela 4.50)**. Pozostałe korelacje nie były istotne statystycznie **(Tabela 4.47, Tabela 4.48, Tabela 4.49, Tabela 4.50)**.

Tabela 4.47 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
SOD	-	0,53	-0,39	0,04	-0,55
GPx	0,53	-	0,44	-0,17	-0,13
CAT	-0,39	0,44	-	-0,37	0,04
GSH	0,04	-0,17	-0,37	-	0,21
MDA	-0,55	-0,13	0,04	0,21	-

Tabela 4.48 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
SOD	-	0,27	-0,21	-0,50	-0,66
GPx	0,27	-	0,57	-0,09	-0,01
CAT	-0,21	0,57	-	0,27	-0,18
GSH	-0,50	-0,09	0,27	-	0,13
MDA	-0,66	-0,01	-0,18	0,13	-

Tabela 4.49 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
SOD	-	0,36	-0,03	-0,18	-0,14
GPx	0,36	-	0,00	0,02	-0,04
CAT	-0,03	0,00	-	0,32	0,22
GSH	-0,18	0,02	0,32	-	0,36
MDA	-0,14	-0,04	0,22	0,36	-

Tabela 4.50 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
SOD	-	0,48	0,23	0,59	0,06
GPx	0,48	-	-0,48	0,03	0,42
CAT	0,23	-0,48	-	**0,80**	**-0,77**
GSH	0,59	0,03	**0,80**	-	-0,50
MDA	0,06	0,42	**-0,77**	-0,50	-

Analizując zależności pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm a parametrami ruchliwości plemników, po uprzednim pogrupowaniu ich ze względu na sezon oraz rodzaj ejakulatu, zanotowano występowanie wielu istotnych korelacji. W sezonie wiosenno-letnim w plemnikach z nasienia białego zaobserwowano powiązanie pomiędzy aktywnością ALP a ALH **(Tabela 4.51)**. Natomiast w tym samym okresie wśród plemników z żółtego nasienia wykazano występowanie bardzo silnej korelacji między aktywnością ACP i STR oraz silnych korelacji pomiędzy aktywnością ACP i LIN, aktywnością ALP i STR oraz aktywnością GPx i BCF **(Tabela 4.52)**. Podczas sezonu jesienno-zimowego silną korelację zaobserwowano pomiędzy aktywnością CAT a VAP z żółtych ejakulatów **(Tabela 4.54)**. W tym samym okresie wykazano dodatkowo wiele innych słabych lub umiarkowanych korelacji. W nasieniu żółtym występowały także korelacje między aktywnością CAT w plazmie a VSL, aktywnością ALP w plazmie a BCF oraz między zawartością białka całkowitego w plazmie a STR **(Tabela 4.54)**. Z kolei w nasieniu białym w sezonie JZ wykazano zależności pomiędzy aktywnością ACP w plazmie a wartościami TMOT, VCL,

STR i LIN, między aktywnością ALP a TMOT i LIN, między aktywnością SOD a STR oraz między zawartością GSH a VCL **(Tabela 4.53)**.

Tabela 4.51 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	0,14	-0,33	-0,20	-0,22	-0,06	0,41	-0,30	-0,06	-0,11
ACP	0,00	0,43	0,11	-0,02	0,27	-0,43	0,50	-0,33	-0,18
ALP	0,71	0,44	0,14	-0,03	0,55	**0,76**	-0,22	-0,25	-0,28
SOD	0,59	0,18	-0,24	-0,27	-0,10	0,51	-0,22	-0,28	-0,28
GPx	-0,38	-0,70	-0,34	-0,18	-0,47	0,04	-0,10	0,16	0,05
CAT	0,51	0,40	0,12	0,02	0,28	0,33	-0,27	-0,11	-0,11
GSH	0,40	0,37	-0,23	-0,39	0,33	0,15	0,48	-0,61	-0,48
MDA	0,47	0,55	-0,08	-0,23	0,24	0,04	0,31	-0,48	-0,35

Tabela 4.52 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	-0,04	0,08	-0,34	-0,43	0,16	0,45	0,02	-0,65	-0,59
ACP	0,62	0,55	-0,52	-0,64	0,11	-0,16	0,37	**-0,90**	**-0,85**
ALP	0,14	-0,13	-0,49	-0,59	-0,03	-0,08	-0,19	**-0,74**	-0,67
SOD	0,65	0,61	0,34	0,21	0,67	-0,48	0,39	-0,41	-0,23
GPx	-0,58	-0,68	0,04	-0,01	0,13	0,46	**-0,75**	-0,13	-0,06
CAT	0,27	0,13	0,47	0,42	0,56	0,08	-0,24	0,13	0,12
GSH	-0,33	-0,13	0,13	0,26	-0,50	-0,48	0,37	0,57	0,61
MDA	0,44	0,56	-0,41	-0,49	0,06	-0,08	0,66	-0,71	-0,64

Tabela 4.53 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	-0,34	-0,31	0,04	0,10	-0,08	-0,13	0,23	0,09	0,07
ACP	**-0,43**	-0,38	0,15	0,39	**-0,39**	-0,38	-0,20	**0,48**	**0,50**
ALP	**-0,39**	-0,25	0,21	0,38	-0,36	-0,36	0,07	0,38	**0,40**
SOD	-0,25	0,09	0,06	0,29	-0,35	-0,25	-0,07	**0,43**	0,37
GPx	-0,27	-0,37	0,13	0,17	-0,12	-0,15	0,06	0,15	0,17
CAT	0,11	0,24	0,17	0,12	0,04	-0,07	-0,13	0,06	0,09
GSH	0,27	0,12	0,09	-0,18	**0,42**	0,28	0,15	-0,38	-0,33
MDA	-0,31	-0,24	0,13	0,23	-0,15	-0,11	0,11	0,27	0,22

Tabela 4.54 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	TMOT	PMOT	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN
Zawartość białka	0,09	0,26	0,55	0,59	0,10	-0,56	0,52	**0,68**	0,50
ACP	0,10	0,09	0,21	0,31	0,10	-0,32	0,48	0,31	0,27
ALP	0,36	0,13	-0,15	-0,16	0,47	-0,18	**0,69**	-0,04	-0,24
SOD	-0,48	-0,60	0,32	0,40	-0,35	-0,34	0,25	0,34	0,42
GPx	-0,49	-0,29	-0,18	0,11	-0,39	-0,29	-0,44	0,29	0,26
CAT	-0,21	-0,10	**0,73**	**0,69**	-0,10	0,04	-0,13	0,59	0,64
GSH	0,45	0,20	-0,19	-0,32	0,40	-0,03	0,46	-0,27	-0,44
MDA	-0,10	-0,02	0,07	0,24	0,34	-0,34	0,31	0,46	0,19

W nasieniu białym z okresu wiosenno-letniego wykazano silne dodatnie korelacje pomiędzy aktywnością SOD w plazmie a koncentracją plemników oraz między aktywnością GPx a odsetkiem plemników generujących NO **(Tabela 4.55)**. Z kolei w nasieniu żółtym zawartość białka całkowitego w plazmie silnie korelowała z PMI i MMP. Ponadto, zawartość GSH bardzo silnie korelowała z PMI **(Tabela 4.56)**. Podczas sezonu jesienno-zimowego w plazmach z nasienia żółtego zaobserwowano występowanie silnej korelacji między aktywnością SOD a odsetkiem plemników generujących NO **(Tabela 4.58)**. W przypadku nasienia białego stwierdzono występowania umiarkowanych zależności między aktywnością ACP a odsetkiem plemników generujących NO oraz aktywnością CAT w plazmie a PMI **(Tabela 4.57)**.

Tabela 4.55 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Zawartość białka	0,17	-0,11	-0,24	0,14	0,29	-0,31	0,20
ACP	-0,27	-0,26	0,62	-0,63	-0,05	0,21	-0,40
ALP	0,65	0,19	-0,18	0,02	0,51	-0,48	0,19
SOD	**0,77**	-0,06	-0,31	0,13	0,52	-0,32	-0,23
GPx	-0,03	0,39	-0,50	**0,73**	-0,11	0,02	0,15
CAT	0,26	-0,24	0,20	-0,35	0,35	-0,20	-0,19
GSH	0,18	-0,15	0,23	-0,46	-0,03	0,05	-0,06
MDA	0,25	-0,36	0,35	-0,61	0,13	0,03	-0,32

Tabela 4.56 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Zawartość białka	-0,18	0,48	**0,81**	**-0,72**	0,23	-0,18	-0,03
ACP	-0,39	0,35	0,19	-0,54	0,69	-0,05	-0,67
ALP	0,10	0,08	-0,21	-0,03	-0,02	0,38	-0,46
SOD	-0,12	0,05	0,17	-0,47	0,39	-0,05	-0,36
GPx	0,48	0,17	0,24	-0,04	-0,64	0,18	0,45
CAT	0,42	0,43	0,00	-0,22	0,03	-0,45	0,53
GSH	-0,28	**-0,93**	-0,36	0,61	-0,30	0,65	-0,49
MDA	-0,46	0,16	0,49	-0,66	0,62	0,03	-0,70

Tabela 4.57 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Zawartość białka	-0,27	0,05	-0,05	0,09	0,14	-0,12	-0,17
ACP	0,26	-0,23	-0,17	**-0,48**	-0,21	0,20	0,10
ALP	0,04	0,02	0,05	0,10	0,12	-0,13	0,13
SOD	-0,16	-0,02	-0,22	-0,13	0,02	-0,03	0,10
GPx	-0,26	-0,08	0,19	-0,19	-0,09	0,11	-0,16
CAT	0,20	**0,46**	-0,11	0,23	0,14	-0,12	-0,14
GSH	0,07	0,35	0,12	0,09	0,01	0,00	-0,10
MDA	0,11	-0,16	-0,15	0,08	0,25	-0,24	-0,09

Tabela 4.58 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

	Koncentracja plemników	PMI	MMP	NO	Plemniki żywe	Plemniki apoptotyczne	Plemniki nekrotyczne
Zawartość białka	-0,31	-0,09	-0,03	0,45	-0,32	0,52	-0,54
ACP	0,11	0,05	0,00	-0,59	0,54	-0,44	-0,56
ALP	-0,16	-0,35	0,57	-0,09	0,13	0,01	-0,51
SOD	0,31	0,01	0,37	**-0,71**	0,10	-0,20	0,28
GPx	0,37	-0,30	0,03	-0,48	0,39	-0,45	0,02
CAT	-0,22	-0,12	-0,62	0,46	-0,10	0,08	0,09
GSH	-0,47	-0,03	0,64	0,22	-0,56	0,64	-0,04
MDA	0,01	-0,41	0,24	-0,15	0,34	-0,17	**-0,71**

Aktywność SOD w plazmach z nasienia białego, z sezonu wiosenno-letniego, korelowała ujemnie z aktywnością GPx oraz dodatnio z zawartością MDA. Ponadto, w tym samym rodzaju nasienia zauważono zależności między zawartościami MDA w plazmach i plemnikach **(Tabela 4.59)**. W próbach nasienia żółtego z tego samego sezonu wykazano korelacje pomiędzy zawartością białka całkowitego w plazmach a aktywnością SOD i zawartością MDA oraz między aktywnością CAT w plemnikach a aktywnością GPx

i zawartością MDA w plazmach **(Tabela 4.60)**. Zawartość GSH w plazmach z nasienia żółtego podczas sezonu jesienno-zimowego koreluje z aktywnością CAT i zawartością MDA w plemnikach, a aktywność ACP z GPx **(Tabela 4.62)**. W nasieniu białym nie stwierdzono występowania silnych korelacji pomiędzy badanymi parametrami biochemicznymi. Jedynymi wykazanymi zależnościami były umiarkowanie silne ujemne korelacje pomiędzy aktywnością ACP w plazmie a SOD w plemnikach oraz zawartością MDA w plazmie a GSH w plemnikach **(Tabela 4.61)**.

Tabela 4.59 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

		Plemniki				
		SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Plazmy	**Zawartość białka**	0,03	-0,26	-0,28	0,39	-0,17
	ACP	0,10	0,62	0,18	0,22	0,47
	ALP	-0,41	-0,52	-0,45	0,64	0,51
	SOD	-0,67	**-0,74**	-0,30	0,31	**0,72**
	GPx	0,32	0,02	-0,01	-0,53	-0,47
	CAT	-0,60	-0,57	-0,15	0,44	0,33
	GSH	0,03	0,40	0,07	0,66	0,52
	MDA	-0,33	0,07	0,05	0,58	**0,74**

Tabela 4.60 Wartości współczynników korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim

		Plemniki				
		SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Plazmy	**Zawartość białka**	**0,73**	0,13	0,12	-0,05	**-0,88**
	ACP	0,25	0,25	0,55	-0,12	-0,67
	ALP	0,27	-0,29	-0,11	-0,36	-0,38
	SOD	-0,47	-0,28	0,40	0,54	-0,27
	GPx	0,39	-0,60	**-0,76**	-0,22	-0,25
	CAT	-0,53	-0,44	-0,07	0,01	0,13
	GSH	-0,35	0,32	0,02	0,52	0,65
	MDA	0,18	0,45	**0,71**	0,29	-0,62

Tabela 4.61 Wartości współczynników korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

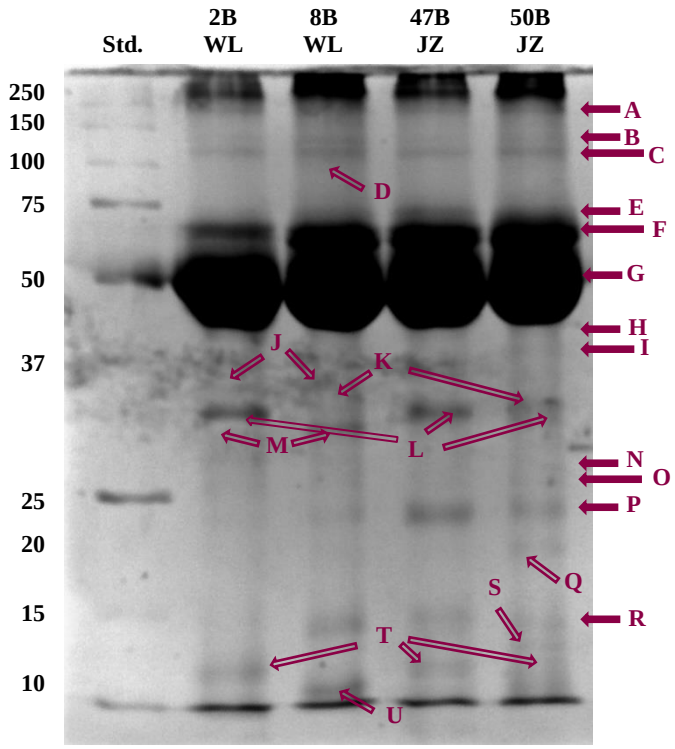
		Plemniki				
		SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Plazmy	**Zawartość białka**	0,37	0,21	-0,28	-0,07	-0,18
	ACP	**-0,45**	-0,20	0,02	0,16	0,02
	ALP	0,24	0,38	-0,30	0,29	-0,11
	SOD	0,23	-0,01	-0,05	0,15	-0,10
	GPx	0,13	-0,19	0,08	0,30	-0,02
	CAT	-0,12	0,08	0,10	-0,21	-0,09
	GSH	-0,14	0,04	-0,19	-0,34	-0,33
	MDA	0,05	-0,19	-0,12	**-0,44**	-0,22

Tabela 4.62 Wartości współczynników korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

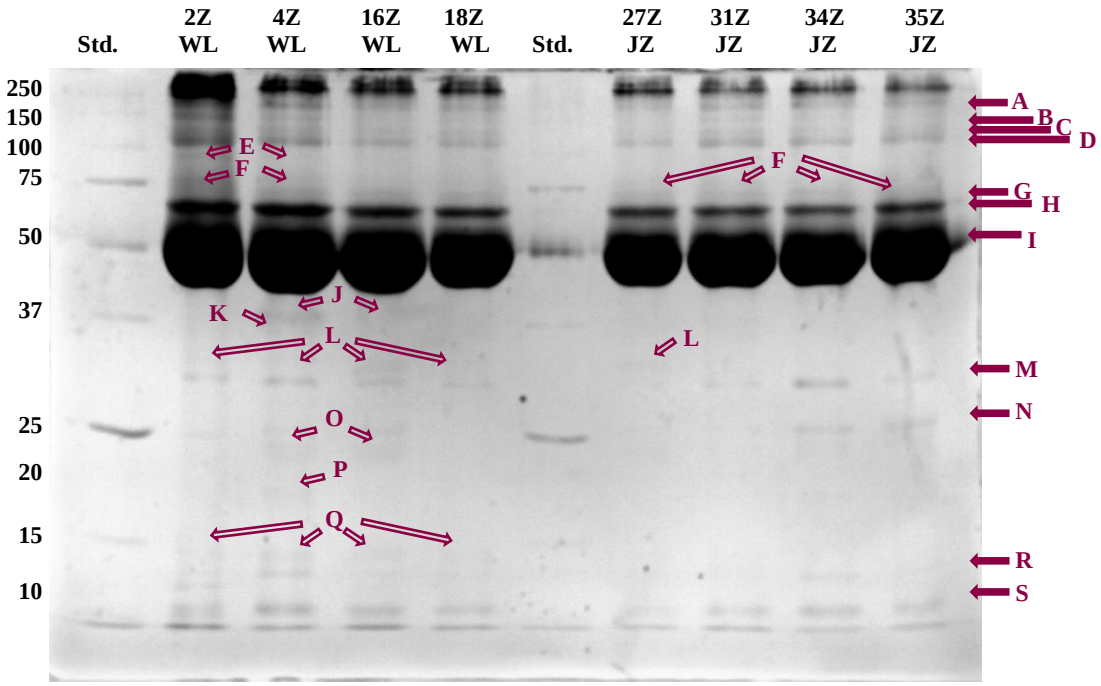
		Plemniki				
		SOD	**GPx**	**CAT**	**GSH**	**MDA**
Plazmy	**Zawartość białka**	0,46	0,26	0,38	0,43	-0,05
	ACP	-0,26	**-0,74**	0,54	0,26	-0,33
	ALP	-0,43	-0,53	0,49	0,06	-0,64
	SOD	-0,31	-0,52	0,36	0,25	-0,25
	GPx	-0,19	-0,21	-0,22	-0,07	0,58
	CAT	0,43	0,47	-0,38	-0,13	0,43
	GSH	0,17	-0,17	**0,72**	0,54	**-0,77**
	MDA	-0,20	-0,24	0,16	0,12	0,04

4.4. Analiza elektroforegramów fosfoprotein izolowanych z plazm nasienia białych i żółtych ejakulatów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodami Native-PAGE, Tricine-PAGE, oraz Urea-PAGE

Analiza fosfoproteomów plazm nasienia metodą Native-PAGE wykazała obecność frakcji białkowych niezależnie od rodzaju nasienia i sezonu. Były to frakcje odpowiadające masom cząsteczkowych 140, 123, 72 i 66 kDa **(Rycina 4.1, Rycina 4.2)**. W profilach fosfoproteomicznych plazm nasienia białego w obu wyróżnionych sezonach **(Rycina 4.1)** wykazano obecność 21 frakcji białkowych. We wszystkich próbach wykazano obecność białek o masach odpowiadających 170, 140, 123, 72, 66, 53, 40, 38, 27, 23 oraz 15 kDa. Charakterystycznymi dla sezonu wiosenno-letniego plazm białych były białka o masach 35 (J), 28 (M) i 8 kDa (U) a dla jesienno-zimowego 108 (D), 18 (Q) i 14 kDa (S) **(Tabela 4.63)**. Z kolei analiza fosfoproteomów plazm nasienia żółtego **(Rycina 4.2)** wykazała obecność 19 frakcji białkowych. Wszystkie badane plazmy zawierały białka o masach odpowiadających 209, 140, 123, 108, 72, 66, 50, 30, 11 i 8 kDa. Charakterystyczne dla sezonu wiosenno-letniego były białka o masach 87 (E), 38 (J), 23 (O) i 14 kDa (Q). Nie wykazano istnienia białek charakterystycznych dla sezonu jesienno-zimowego w profilach plazm nasienia żółtego **(Tabela 4.64)**. Frakcje białkowe o masach 38 i 23 kDa były obecne podczas sezonu wiosenno-letniego niezależnie od rodzaju nasienia, jednak występowały również w fosfoproteomach plazm nasienia białego w sezonie jesienno-zimowym **(Rycina 4.1, Rycina 4.2, Tabela 4.63, Tabela 4.64)**. Frakcjami specyficznymi dla plazm pochodzących z nasienia białego były białka o masach odpowiadających 170 (A), 53 (G), 40 (H), 28 (M), 27 (N) oraz 15 kDa (R) **(Rycina 4.1, Tabela 4.63)**, a dla plazm z nasienia żółtego byłe te o masach 209 (A), 75 (F) oraz 50 kDa (I) **(Rycina 4.2, Tabela 4.64)**. Białkami występującymi jedynie w plazmach nasienia żółtego sezonu wiosenno-letniego były te o masach 87 (E), 32 (L) oraz 14 kDa (Q) **(Rycina 4.1, Tabela 4.63)**, a w plazmach z nasienia białego białka – 35 (J) oraz 28 kDa (M) (**Rycina 4.2, Tabela 4.64)**.



Rycina 4.1 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia białego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE



Rycina 4.2 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE

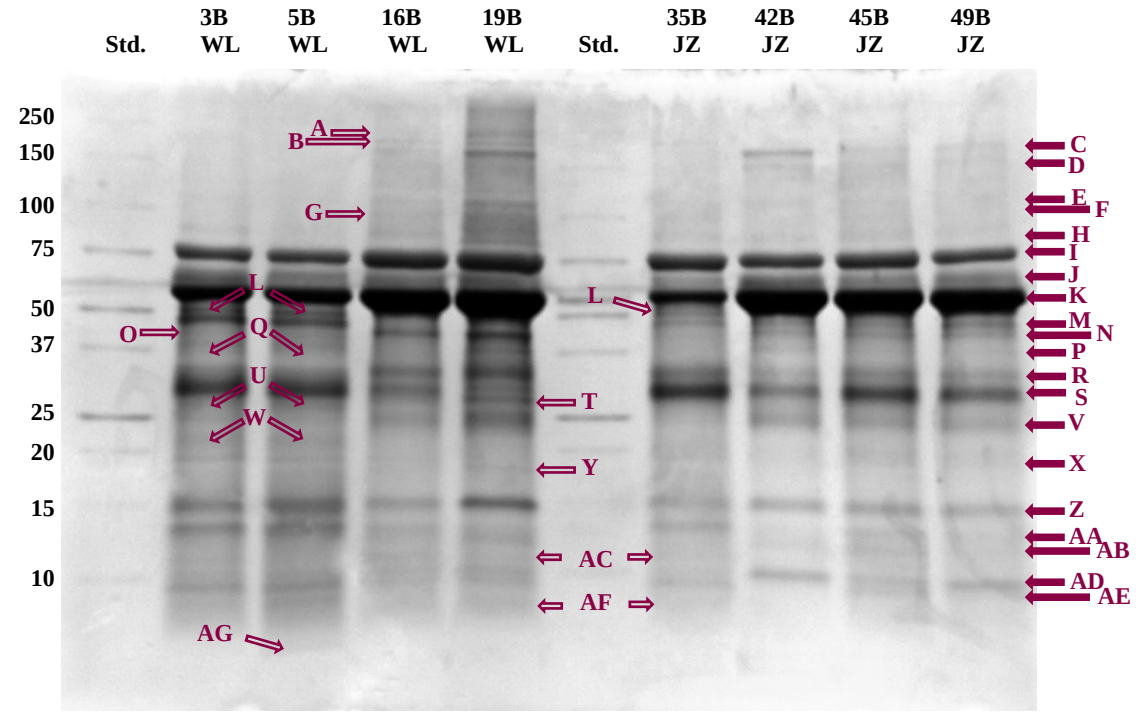
Tabela 4.63 Porównanie profili białkowych wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]																				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**
Lp.	**170**	**140**	**123**	**108**	**72**	**66**	**53**	**40**	**38**	**35**	**32**	**30**	**28**	**27**	**26**	**23**	**18**	**15**	**14**	**11**	**8**
2B WL	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
8B WL	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
22B JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
30B JZ	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-

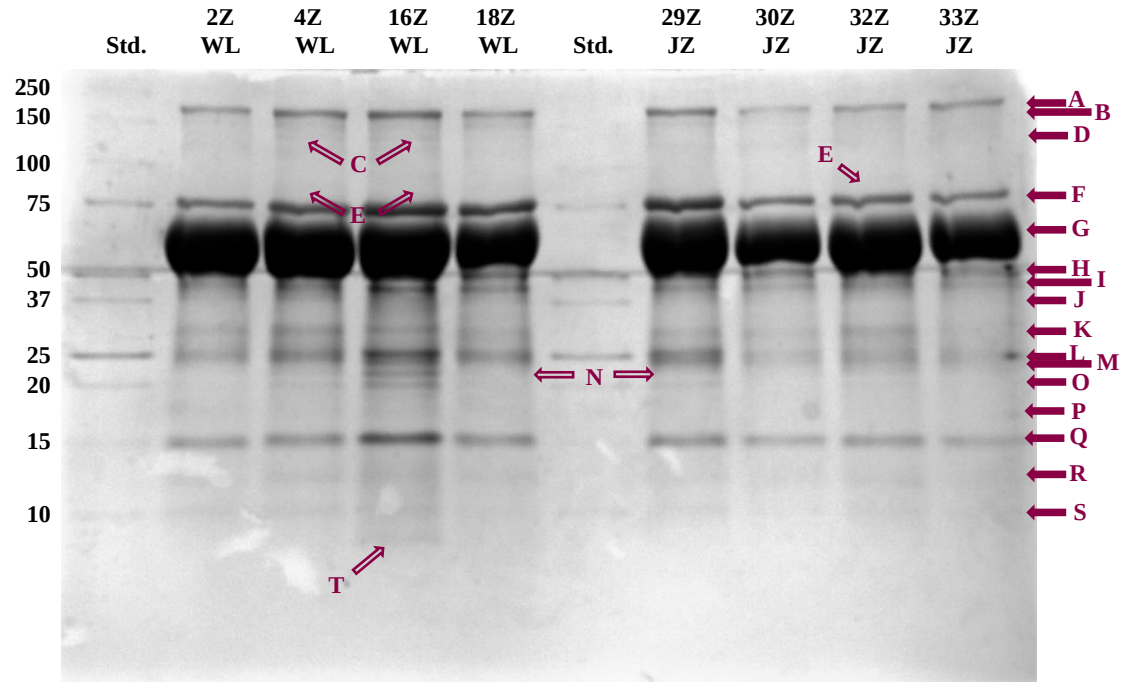
Tabela 4.64 Porównanie profili białkowych wybranych plazm żółtego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]																		
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**
Lp.	**209**	**140**	**123**	**108**	**87**	**75**	**72**	**66**	**50**	**38**	**35**	**32**	**30**	**26**	**23**	**18**	**14**	**11**	**8**
2Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
4Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16Z WL	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
18Z WL	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
27Z JZ	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
31Z JZ	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
34Z JZ	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
35Z JZ	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+

Wykorzystanie metody Tricine-PAGE **(Rycina 4.3, Rycina 4.4)** pozwoliło na wykazanie, że frakcje o masach 75, 67, 38, 25, 15, 13 oraz 10 kDa występują we wszystkich próbach niezależnie od rodzaju nasienia i sezonu **(Tabela 4.65, Tabela 4.66)**. Profile plazm białego nasienia zawierały 33 frakcje białkowe. Wszystkie profile niezależnie od sezonu wykazywały obecność białek o masach 104, 87, 75, 67, 62, 38, 35, 32, 25, 18, 15, 13, 12 oraz 10 kDa. Frakcje o masach 98 (G), 45 (O), 37 (Q), 30 (T), 22 (W) i 17 kDa (Y) były charakterystyczne dla plazm białego nasienia w sezonie wiosenno-letnim. Podczas sezonu jesienno-zimowego wykazano obecność jednego takiego białka o masie 48 kDa (N) **(Rycina 4.3, Tabela 4.65)**. W profilach fosfoproteomicznych plazm żółtego nasienia wykazano obecność 20 frakcji białkowych, z czego we wszystkich próbach było obecne 13 z nich. Były to fosfoproteiny o masach 209, 176, 128, 75, 67, 43, 38, 28, 25, 20, 15, 13 i 10 kDa. Charakterystyczne dla tej grupy podczas sezonu wiosenno-letniego jest białko o masie 147 kDa (C), dla sezonu jesienno-zimowego białko o masie 24 kDa (M) **(Rycina 4.4, Tabela 4.66)**. Frakcje o masach 220 (A), 154 (C), 104 (E), 100 (F), 98 (G), 62 (K), 49 (M), 48 (N), 35 (R), 32 (S), 30 (T), 18 (X), 12 (AB), 11 (AD), 9 (AE) oraz 5 kDa (AG) były specyficzne dla plazm białego nasienia. W przypadku plazm żółtego nasienia specyficzne były frakcje o masach 176 (B), 128 (D), 43 (I), 24 (M) i 20 kDa (O). Frakcje białkowe o masach 28 i 17 kDa występowały w profilach plazm nasienia żółtego bez względu na okres oraz w plazmach nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim **(Rycina 4.3, Rycina 4.4, Tabela 4.65, Tabela 4.66)**. Frakcjami białkowymi występującymi jedynie w profilach plazm pochodzących z białego nasienia w sezonie wiosenno-letnim były te o masach 45 (O), 37 (Q) oraz 30 kDa (T). Natomiast w plazmach tego samego rodzaju w sezonie jesienno-zimowym występowało jedno charakterystyczne białko o masie 48 kDa (N) **(Rycina 4.3, Tabela 4.65)**.



Rycina 4.3 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia białego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE



Rycina 4.4 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE

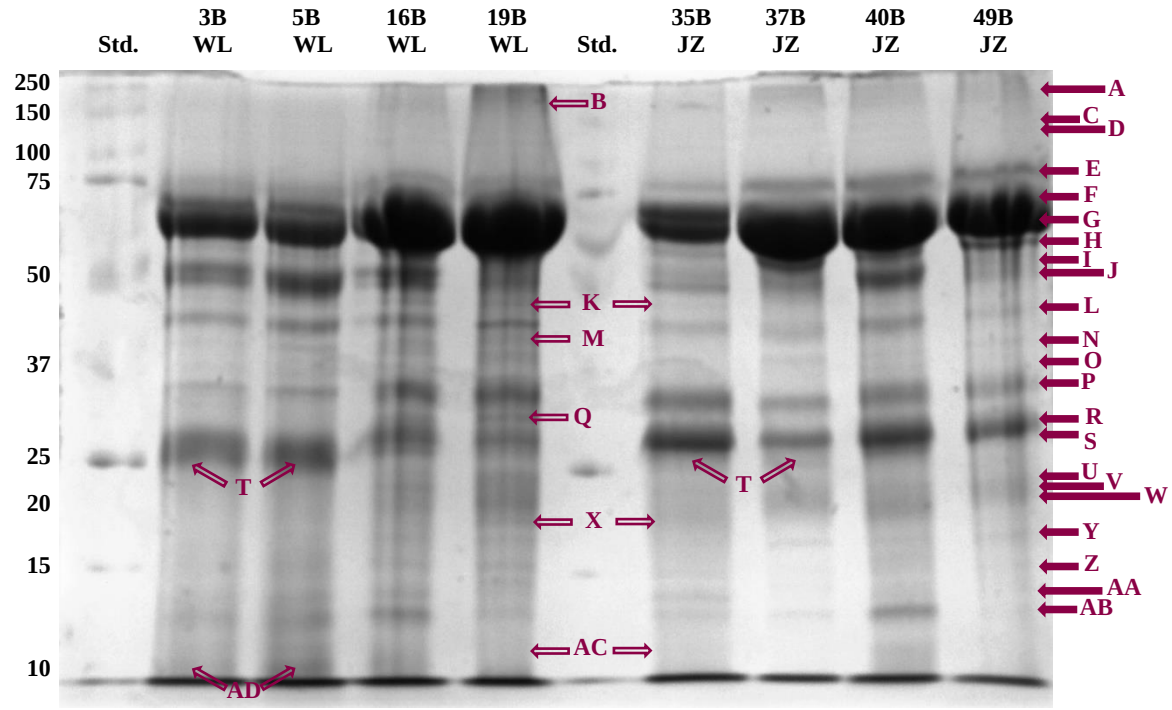
Tabela 4.65 Porównanie profili białkowych Tricine-PAGE wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]																														
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**	**W**	**X**	**Y**	**Z**	**AA**	**AB**	**AC**	**AD**	**AE**	**AF**	**AG**
Lp.	**220**	**209**	**154**	**147**	**104**	**100**	**98**	**87**	**75**	**67**	**62**	**50**	**49**	**48**	**45**	**38**	**37**	**35**	**32**	**30**	**28**	**25**	**22**	**18**	**17**	**15**	**13**	**12**	**11**	**10**	**9**	**8**	**5**
3B WL	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5B WL	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
35B JZ	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
42B JZ	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
45B JZ	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
49B JZ	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-

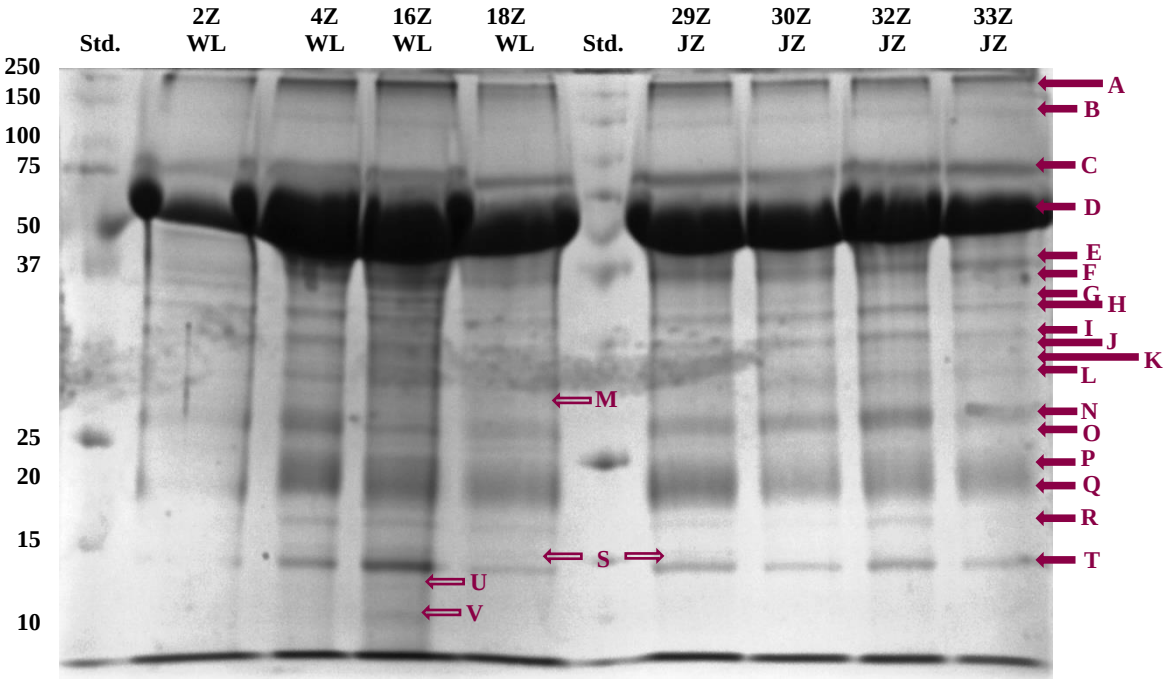
Tabela 4.66 Porównanie profili białkowych Tricine-PAGE wybranych żółtych plazm nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]																			
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**
Lp.	**209**	**176**	**147**	**128**	**87**	**75**	**67**	**50**	**43**	**38**	**28**	**25**	**24**	**22**	**20**	**17**	**15**	**13**	**10**	**8**
2Z WL	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
4Z WL	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
16Z WL	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18Z WL	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
29Z JZ	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
30Z JZ	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
32Z JZ	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
33Z JZ	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-

Wykorzystanie metody Urea-PAGE pozwoliło na wykazanie obecności pięciu frakcji białkowych występujących we wszystkich profilach prób w obu badanych okresach bez względu na rodzaj nasienia **(Rycina 4.5, Rycina 4.6)**. Masy cząsteczkowe omawianych frakcji oznaczono na: 75, 49, 37, 31 oraz 14 kDa **(Tabela 4.67, Tabela 4.68)**. Frakcje, które zaobserwowano we wszystkich badanych próbach plazm białego nasienia charakteryzowały się masami 104, 75, 62, 49, 45, 41, 37, 31, 26, 22, 15, 14 oraz 13 kDa. W sezonie wiosenno-letnim plazmy nasienia białego wykazywały obecność specyficznych frakcji o masach 209 (B), 72 (F), 47 (K), 43 (M), 28 (Q), 11 (AC) i 10 kDa (AD), a w sezonie jesienno-zimowym o masie 234 kDa (A) **(Rycina 4.5, Tabela 4.67)**. Frakcje białkowe o masach 147, 75, 67, 49, 37, 35, 32, 31, 30, 28, 23 oraz 14 kDa były obecne we wszystkich próbach plazm z żółtego nasienia. Występującymi podczas sezonu wiosenno-letniego w profilach plazm nasienia żółtego były frakcje o masach 29 (M), 15 (S), 13 (U) oraz 10 kDa (V) **(Rycina 4.6, Tabela 4.68)**. W plazmach z okresu wiosenno-letniego obserwowano białko o masie 10 kDa bez względu na rodzaj nasienia. Białkami charakterystycznymi jedynie dla plazm białego nasienia były te opisane masami – 209 (B), 104 (D), 72 (F), 62 (G), 57 (H), 52 (I), 45 (L), 43 (M), 31 (P), 27 (R), 26 (S), 22 (V), 20 (W), 18 (X) oraz 11 kDa (AC) **(Rycina 4.5, Tabela 4.67)**, a dla plazm nasienia żółtego – 67 (D), 35 (I), 32 (J), 30 (L), 29 (M) i 16 kDa (R) **(Rycina 4.6, Tabela 4.68)**. Frakcje o masach 209 (B) oraz 43 kDa (M) występowały jedynie w plazmach nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim **(Rycina 4.5, Tabela 4.67)**, a dla plazm nasienia żółtego w tym samym sezonie, charakterystyczna była frakcja o masie 29 kDa (M) **(Rycina 4.6, Tabela 4.68)**.



Rycina 4.5 Profil fosfoprotein wybranych plazm białego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE



Rycina 4.6 Profil fosfoprotein wybranych plazm żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE

Tabela 4.67 Porównanie profili białkowych Urea-PAGE wybranych plazm nasienia białego indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]																													
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**	**W**	**X**	**Y**	**Z**	**AA**	**AB**	**AC**	**AD**
Lp.	**234**	**209**	**147**	**104**	**75**	**72**	**62**	**57**	**52**	**49**	**47**	**45**	**43**	**41**	**37**	**31**	**28**	**27**	**26**	**25**	**23**	**22**	**20**	**18**	**17**	**15**	**14**	**13**	**11**	**10**
3B WL	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
5B WL	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
16B WL	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
19B WL	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
35B JZ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
37B JZ	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
40B JZ	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
49B JZ	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tabela 4.68 Porównanie profili białkowych Urea-PAGE wybranych żółtych plazm nasienia żółtego indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]																					
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**
Lp.	**234**	**147**	**75**	**67**	**49**	**47**	**41**	**37**	**35**	**32**	**31**	**30**	**29**	**28**	**25**	**23**	**17**	**16**	**15**	**14**	**13**	**10**
2Z WL	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
4Z WL	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
16Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
29Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
30Z JZ	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
32Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
33Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-

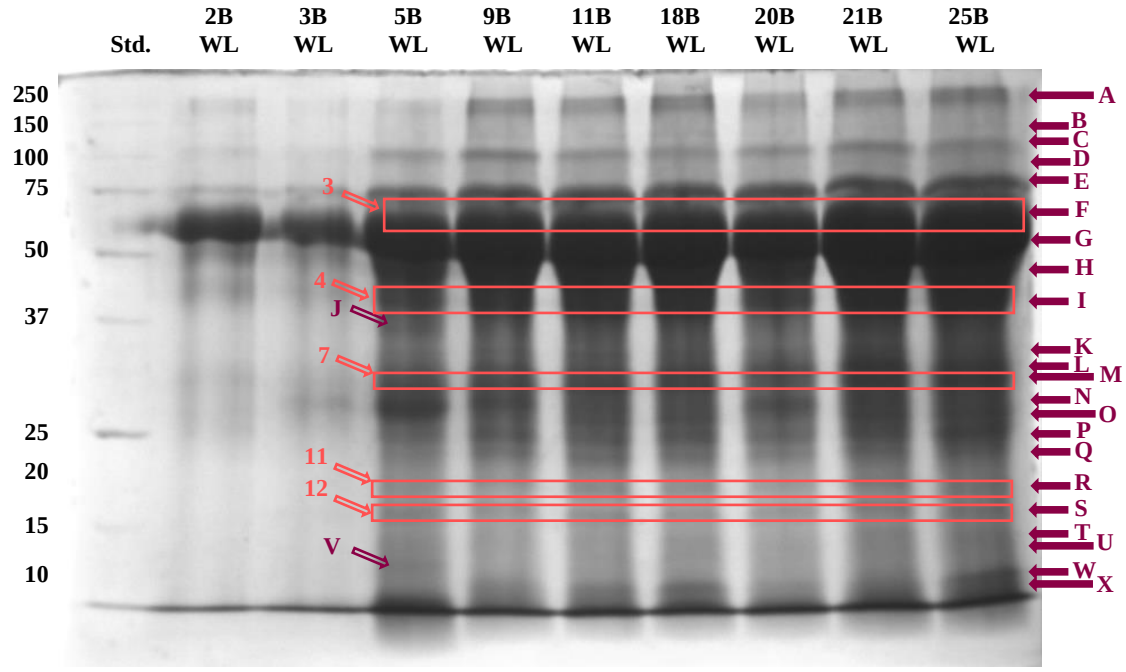
4.5. Identyfikacja fosfoprotein plazm białego i żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym metodami spektrometrii mas na podstawie elektroforegramów uzyskanych metodami SDS-PAGE i 2D-PAGE

Przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE dokonano rozdziału fosfoproteomów białych i żółtych plazm nasienia pobranych w obu badanych sezonach, który posłużył następnie do przeprowadzenia identyfikacji fosfoprotein.

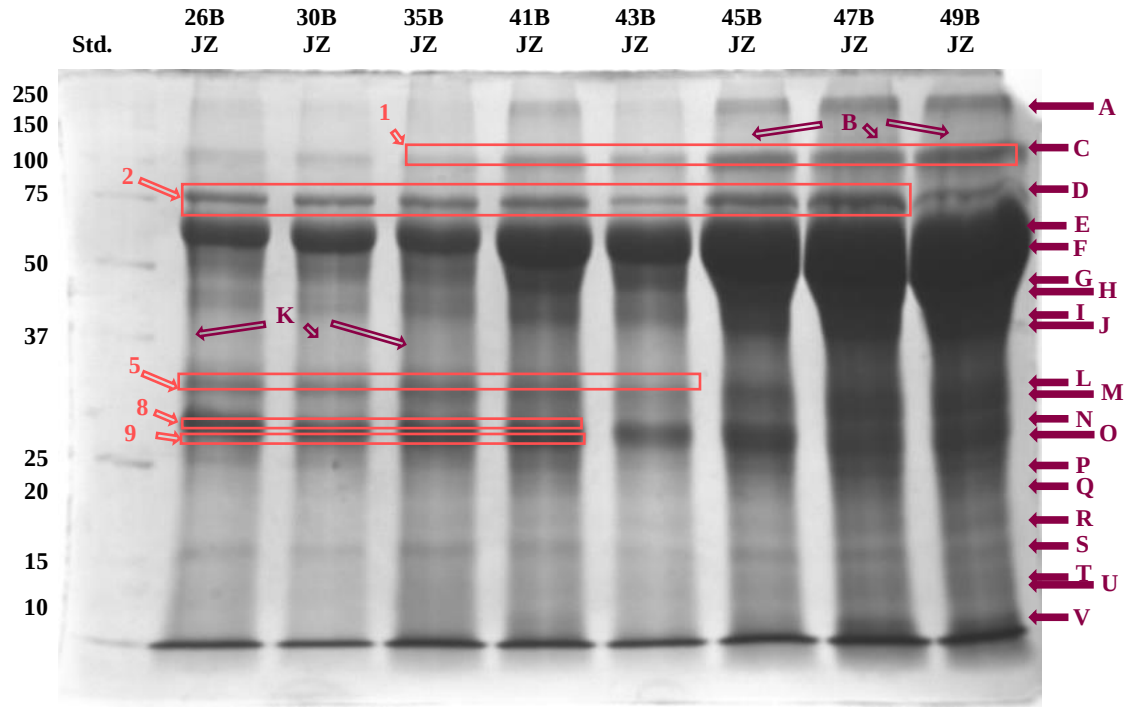
W profilach wszystkich prób niezależnie od rodzaju nasienia i okresu pobrania**,** wykazano występowanie pięciu białek o masach cząsteczkowych 106, 76, 57, 52 i 41 kDa **(Rycina 4.7, Rycina 4.8, Rycina 4.9, Rycina 4.10, Tabela 4.69, Tabela 4.70, Tabela 4.71, Tabela 4.72)**. Frakcjami białkowymi charakterystycznymi dla plazm białego nasienia były te o masach 36, 29 oraz 27 kDa, a dla plazm żółtego nasienia białko o masie 18 kDa **(Rycina 4.7, Rycina 4.8, Rycina 4.9, Rycina 4.10)**. Z kolei biorąc pod uwagę okres, w którym ejakulaty zostały pozyskane, frakcjami specyficznymi dla sezonu wiosenno-letniego były fosfoproteiny o masach 224 i 22 kDa **(Rycina 4.7, Rycina 4.9, Tabela 4.69, Tabela 4.71)**, a dla okresu jesienno-zimowego 242 i 17 kDa **(Rycina 4.8, Rycina 4.10, Tabela 4.70, Tabela 4.72)**. Dwie frakcje białek o masach cząsteczkowych 30 i 26 kDa były wspólne dla plazm pochodzących z nasienia żółtego niezależnie od sezonu oraz plazm nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim (**Rycina 4.7, Rycina 4.9, Rycina 4.10, Tabela 4.69, Tabela 4.71, Tabela 4.72)**. Frakcje fosfoproteinowe o masach 47 i 11 kDa wykazano w plazmach nasienia żółtego niezależnie od sezonu i białego w sezonie jesienno-zimowym **(Rycina 4.8, Rycina 4.9, Rycina 4.10, Tabela 4.70, Tabela 4.71, Tabela 4.72)**. Fosfoproteiny o masach 87, 14 i 13 kDa występowały wyłącznie w plazmie nasienia białego podczas sezonu wiosenno-letniego **(Rycina 4.7, Tabela 4.69)**. W sezonie jesienno-zimowym specyficznymi dla ejakulatów tego samego rodzaju były frakcje 43 i 28 kDa **(Rycina 4.8, Tabela 4.70)**. Frakcje o masach cząsteczkowych 102 i 19 kDa występowały tylko plazmach nasienia żółtego w sezonie jesienno-zimowym **(Rycina 4.10, Tabela 4.72)**.

Na rycinach czerwonymi ramkami zaznaczono frakcje wycięte z żeli SDS-PAGE i poddane identyfikacji spektrometrycznej metodą Nano LC-MS/MS **(Rycina 4.7, Rycina 4.8, Rycina 4.9, Rycina 4.10)**. Potwierdzeniem różnic występujących pomiędzy wyróżnionymi grupami były średnie wartości gęstości optycznych (OD) dla poszczególnych frakcji w **Tabelach 4.73 i 4.74**.Wyniki identyfikacji wyizolowanych fosfoprotein plazm

nasienia indora za pomocą spektrometrii mas Nano LC-MS/MS zostały umieszczone w **Tabeli 4.75**.



Rycina 4.7 Profil fosfoprotein wybranych plazm białego nasienia w sezonie wiosenno-letnim uzyskanych metodą SDS-PAGE



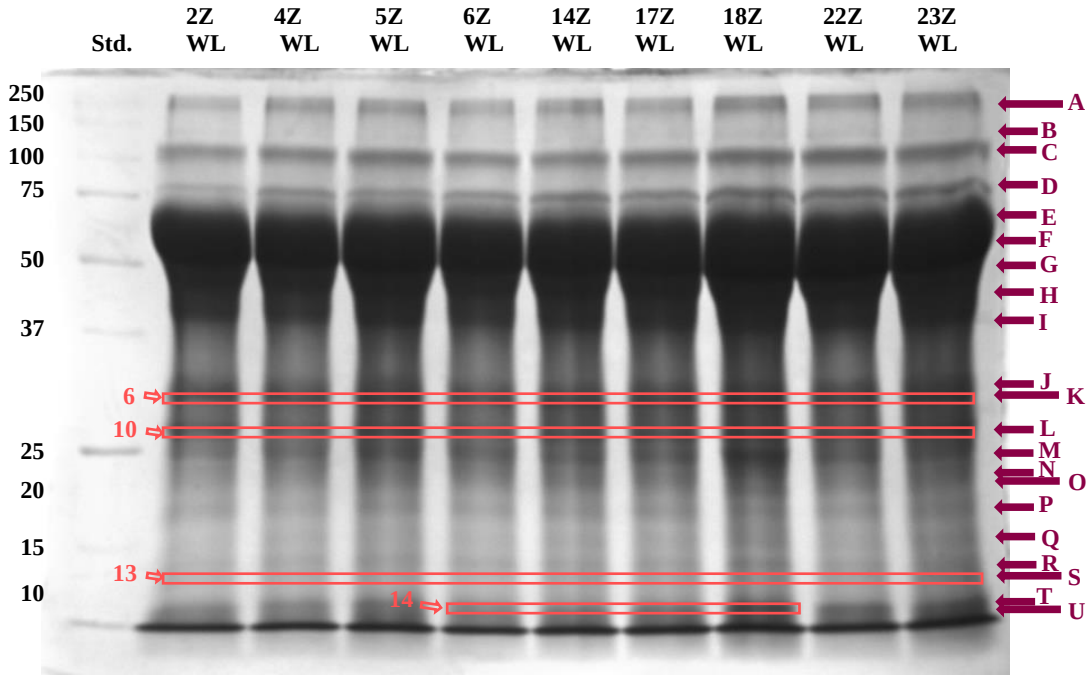
Rycina 4.8 Profil fosfoprotein wybranych plazm białego nasienia w sezonie jesienno-zimowym uzyskanych metodą SDS-PAGE

Tabela 4.69 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonie wiosenno-letnim

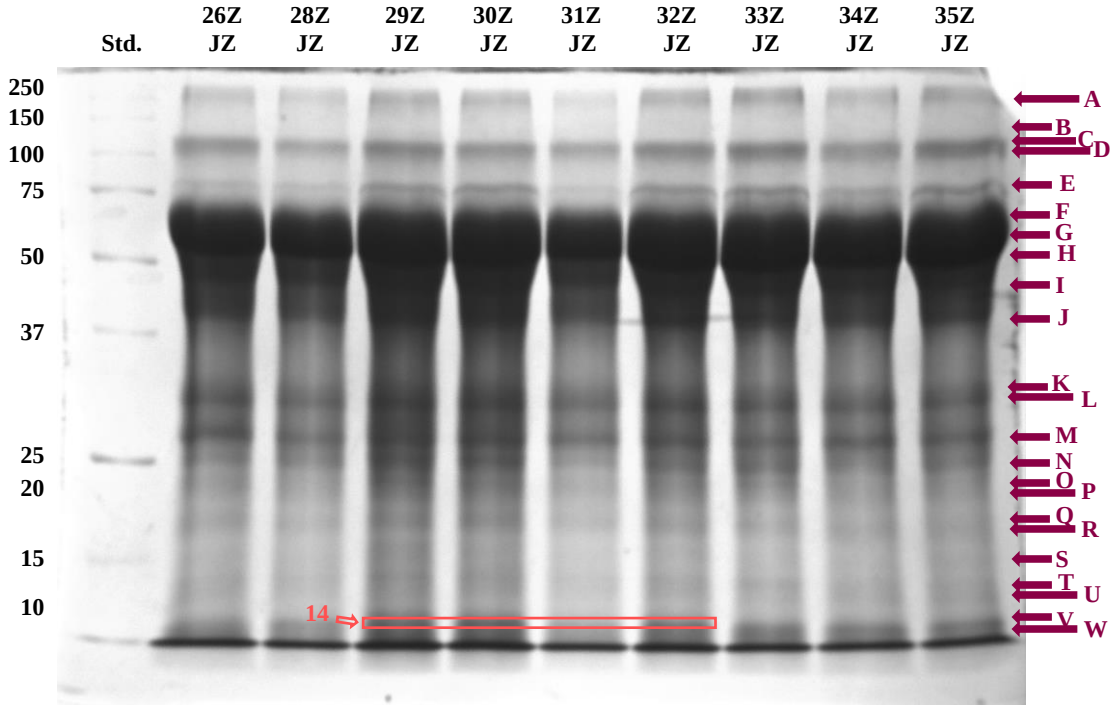
	Masy cząsteczkowe [kDa]																						
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**	**W**	**X**
Lp.	**224**	**132**	**106**	**87**	**76**	**69**	**57**	**52**	**41**	**36**	**31**	**30**	**29**	**27**	**26**	**24**	**22**	**20**	**16**	**14**	**13**	**12**	**7**	**5**
2B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
3B WL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
5B WL	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
11B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
18B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
20B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
21B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
25B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Tabela 4.70 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonie jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]																					
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**
Lp.	**242**	**132**	**106**	**76**	**69**	**57**	**52**	**47**	**43**	**41**	**36**	**31**	**29**	**28**	**27**	**24**	**20**	**17**	**16**	**12**	**11**	**5**
26B JZ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
30B JZ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
35B JZ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
41B JZ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43B JZ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
45B JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47B JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49B JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Rycina 4.9 Profil fosfoprotein wybranych plazm żółtego nasienia w sezonie wiosenno-letnim uzyskanych metodą SDS-PAGE



Rycina 4.10 Profil fosfoprotein wybranych plazm żółtego nasienia w sezonie jesienno-zimowym uzyskanych metodą SDS-PAGE

Tabela 4.71 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych plazm żółtego nasienia indorów w sezonie wiosenno-letnim

	Masy cząsteczkowe [kDa]																				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**
Lp.	**224**	**132**	**106**	**76**	**69**	**57**	**52**	**47**	**41**	**31**	**30**	**26**	**24**	**22**	**20**	**18**	**16**	**12**	**11**	**7**	**5**
2Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 4.72 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych żółtych plazm nasienia indorów w sezonie jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]																						
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**	**W**
Lp.	**242**	**132**	**106**	**102**	**76**	**69**	**57**	**52**	**47**	**41**	**31**	**30**	**26**	**24**	**20**	**19**	**18**	**17**	**16**	**12**	**11**	**7**	**5**
26Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
28Z JZ	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
29Z JZ	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
30Z JZ	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
31Z JZ	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
32Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
33Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
34Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
35Z JZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 4.73 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów

Białko	Plazmy nasienia białego	Plazmy nasienia żółtego
1	0,23	0,28
2	0,41	0,26
3	0,70	0,83
4	0,45	0,49
5	0,50	0,69
6	0,45	0,48
8	0,40	0,46
11	0,30	0,34
12	0,24	0,28
13	0,23	0,19
14	0,24	0,19

Tabela 4.74 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm nasienia pobranych w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia

Białko	Sezon wiosenno-letni	Sezon jesienno-zimowy
1	0,24	0,28
4	0,45	0,52
6	0,44	0,50
7	0,38	0,43
9	0,43	0,48
10	0,43	0,47
11	0,33	0,31
12	0,24	0,28

Tabela 4.75 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z plazm nasienia uzyskanych metodami SDS-PAGE oraz Nano LC-MS/MS

Nr	Zidentyfikowane białko	Gen kodujący	Gatunek	Masa cząsteczkowa wg Multi-Analyst	Masa cząsteczkowa (Da)	Liczba zgodnych peptydów	Pokrycie sekwencji [%]	Score
1	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	106 kDa	71868	126	47	2578
	Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	*Gallus gallus*		45186	20	19	969
	Fibronektyna	FN1	*Gallus gallus*		276669	12	5	514
	Miozyna-9	MYH9	*Gallus gallus*		227446	5	4	271
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*		341740	6	2	196
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	14	21	181
	ATPaza 13a4 transportująca kationy	ATP13A4	*Gallus gallus*		135682	6	4	155
	Syntaza kwasów tłuszczowych	FASN	*Gallus gallus*		277630	3	1	91
	Białko 1 dla receptora LDL	LRP1	*Gallus gallus*		525788	1	1	83
	Fosfataza eta białek tyrozynowych typu receptorowego	PTPRJ	*Gallus gallus*		155087	2	1	72
	Kinaza białek tyrozynowych typu protoonkogenowego	ROS1	*Gallus gallus*		263419	2	1	60
2	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	76 kDa	71868	583	58	5722
	Czynnik elongacyjny II	EEF2	*Gallus gallus*		96343	18	23	720
	Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	*Gallus gallus*		45186	12	19	589
	Fibronektyna	FN1	*Gallus gallus*		276669	8	4	237
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*		341740	3	1	153
	Białko NEL	NEL	*Gallus gallus*		96096	7	6	151
	Alfa-aktynina 1	ACTN1	*Gallus gallus*		103610	4	2	88
	Alfa-aktynina 4	ACTN4	*Gallus gallus*		104712	4	2	88
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	12	22	66
	Cytoplazmatyczna hydrataza akonitanowa (akonitaza)	ACO1	*Gallus gallus*		98639	1	2	61
3	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*	69 kDa	79551	437	71	2016
	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	76	35	1534
	Receptor 1 transferyny	TFRC	*Gallus gallus*		85890	3	20	146
	Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	*Gallus gallus*		45186	2	15	112
	Chaperon BIP z retikulum endoplazmatycznego	HSPA5	*Gallus gallus*		72088	1	2	68
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*		83939	1	7	63
4	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	41 kDa	71868	83	26	3346
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	28	17	1187

	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	25	45	1005
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	25	45	1005
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	15	37	809
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*		83939	22	11	792
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	23	38	789
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	18	15	592
	Aneksyna A2	ANXA2	*Gallus gallus*		38901	8	16	333
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	8	5	332
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	3	9	188
	Dehydrogenaza mleczanowa (łańcuch A)	LDHA	*Gallus gallus*		36776	4	9	182
	Dehydrogenaza mleczanowa (łańcuch B)	LDHB	*Gallus gallus*		36694	4	8	174
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	3	9	166
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	5	7	165
	Białko 4B ciałka wielopęcherzykowego	CHMP4B	*Gallus gallus*		25140	3	9	137
	Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	*Gallus gallus*		45186	3	6	130
	Łańcuch beta tubuliny	TBB1 TBB2 TBB3 TBB4 TBB5 TBB6 TBB7	*Gallus gallus*	41 kDa	50333 50377 50285 50844 50395 50692 50095	5	4	122
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	2	4	120
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	3	6	113
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*		84406 83717	3	3 3	99
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	2	6	93
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	1	4	87
	Neuronalny czynnik regulujący NEGR1 (Neurotraktyna)	NEGR1	*Gallus gallus*		38434	1	3	64
	Łańcuch alfa-2 tubuliny	TBA2	*Gallus gallus*		50450	1	3	63

	Podjednostka alfa-1 białka czapeczkującego F-aktynę	CAPZA1	*Gallus gallus*		33110	1	3	59
	Podjednostka alfa-2 białka czapeczkującego F-aktynę	CAPZA2	*Gallus gallus*		32939	1	3	59
	Klusteryna	CLU	*Coturnix japonica*		52395	1	5	57
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	1	2	56
	Białko NEL	NEL	*Gallus gallus*	41 kDa	96096	1	1	56
	Aminopeptydaza Ey	ANPEP	*Gallus gallus*		109406	1	1	54
	Radyksyna	RDX	*Gallus gallus*		68626	1	1	52
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	1	4	50
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*		341740	1	1	50
5	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	27	32	996
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*		83939	17	9	711
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	11	19	595
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	9	8	343
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	9	6	278
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	4	9	224
	Fibronektyna	FN1	*Gallus gallus*		276669	3	2	220
	Neuronalny czynnik regulujący NEGR1 (Neurotraktyna)	NEGR1	*Gallus gallus*		38434	7	17	215
	Aneksyna A2	ANXA2	*Gallus gallus*		38901	4	13	210
	Białko 1 aparatu Golgiego	GLG1	*Gallus gallus*		43386	2	4	189
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	3	4	112
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*	31 kDa	84406 83717	3	3	105
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	2	1	101
	Aminopeptydaza Ey	ANPEP	*Gallus gallus*		109406	3	2	99
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	1	5	82
	Białko NEL	NEL	*Gallus gallus*		96096	3	1	78
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*		341740	2	1	78
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	1	4	77
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	2	2	70
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	Gallus gallus		35909	1	4	58
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	1	4	58
	Łańcuch beta-1 tubuliny	TBB1	*Gallus gallus*		50333	1	3	52
	Łańcuch beta-2 tubuliny	TBB2	*Gallus gallus*		50377	1	3	52
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	1	3	52
	Łańcuch beta-7 tubuliny	TBB7	*Gallus gallus*		50095	1	3	52
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	1	2	48

	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*	31 kDa	42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	1	5	71
	Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	*Gallus gallus*		45186	1	6	40
6	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	30 kDa	71868	66	22	2198
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	7	13	390
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	9	10	303
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	6	8	282
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	4	9	196
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	3	9	170
	Podjednostka teta białka 1 T-kompleksu	CCT8	*Gallus gallus*		60017	2	2	147
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	2	3	130
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*		83939	2	1	102
	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*		73285	2	4	100
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	2	4	86
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	2	4	86
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	1	3	86
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	1	4	82
	Aneksyna A1	ANXA1	*Gallus gallus*		14446	1	4	72
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	1	10	66
	Receptor sprzężony z białkiem G	FZD7	*Gallus gallus*		64081	1	5	45
7	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	29 kDa	71868	31	28	794
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	18	18	362
	Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	*Gallus gallus*		45186	6	11	361
	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*		73285	9	8	240
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	2	11	96
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	2	3	86
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	1	22	67
8	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	28 kDa	71868	61	54	2571
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	16	28	951
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*		83939	8	9	322
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	6	5	298

	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*	28 kDa	38724	6	11	282
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	6	7	277
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	7	14	269
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	6	9	267
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	6	9	267
	Białko zeta 14-3-3	YWHAZ	*Gallus gallus*		27929	5	25	229
	Mutaza fosfoglicerynianowa 1	PGAM1	*Gallus gallus*		29051	5	22	203
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	4	11	173
	Białko theta 14-3-3	YWHAQ	*Gallus gallus*		28050	3	21	168
	Łańcuch alfa tubuliny	TBA1 TBA8	*Gallus gallus*		46385 36651	4	4	149
	Aktyna	ACTB ACTG ACT5	*Gallus gallus*		42052 42108 42151	3	9	143
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	2	3	123
	Fibronektyna	FN1	*Gallus gallus*		276669	3	1	114
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	2	5	110
	Białko epsilon 14-3-3	YWHAE	*Gallus gallus*		29326	2	11	102
	Łańcuch beta tubuliny	TBB1 TBB2 TBB3 TBB4 TBB5 TBB6 TBB7	*Gallus gallus*		50333 50377 50285 50844 50395 50692 50095	3	10	97
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*		341740	2	1	85
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	1	4	85
	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*		73285	1	2	73
	Białko NEL	NEL	*Gallus gallus*		96096	2	1	70
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	2	2	70
	Podjednostka alfa-2 acetylohydrolazy IB czynnika aktywującego płytki (PAF)	PAFAH1B2	*Gallus gallus*		25665	1	3	56
	Peroksyredoksyna-6	PRDX6	*Gallus gallus*		25075	1	3	56
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	1	4	50
9	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	27 kDa	71868	43	59	1660

	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	10	6	352
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	7	5	342
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	7	11	270
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	7	9	265
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	7	6	234
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*		83939	5	5	222
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	8	12	2110
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	5	9	195
	Łańcuch ciężki ferrytyny	FTH	*Gallus gallus*		21249	8	18	190
	Łańcuch beta tubuliny	TBB1 TBB2 TBB3 TBB4 TBB5 TBB6 TBB7	*Gallus gallus*		50333 50377 50285 50844 50395 50692 50095	5	11	148
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*	27 kDa	341740	1	1	100
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	2	4	70
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	2	4	70
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*		84406 83717	3	1	105
	Peroksyredoksyna-1	PRDX1	*Gallus gallus*		22529	2	5	65
	Peroksyredoksyna-6	PRDX6	*Gallus gallus*		25075	2	8	65
	Peptydylo-prolyl cis/trans izomeraza B	PPIB	*Gallus gallus*		22456	7	23	232
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	1	9	56
	Białko NEL	NEL	*Gallus gallus*		96096	1	6	55
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	1	9	54
	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*		73285	1	12	54
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	1	8	71
	GTPaza HRAS	HRAS	*Gallus gallus*		21694	1	4	47

	GTPaza NRAS	NRAS		27 kDa	21550	1	4	47
	Neuronalny czynnik regulujący NEGR1 (Neurotraktyna)	NEGR1	*Gallus gallus*		38434	1	6	46
10	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	71	63	2910
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	8	15	271
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	11	24	264
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	5	8	213
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	11	5	264
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	6	8	176
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	6	8	176
	Mutaza fosfoglicerynianowa 1	PGAM1	*Gallus gallus*		29051	2	15	167
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	4	3	163
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	2	9	137
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*	26 kDa	35909	3	4	129
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	3	4	129
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	2	7	98
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	1	4	71
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	1	3	69
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	1	4	57
11	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	52	58	1967
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	21	13	891
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	18	23	881
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	8	15	594
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	15	13	492
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	10	7	431
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*	20 kDa	83939	12	7	405
	Łańcuch ciężki ferrytyny	FTH	*Gallus gallus*		21249	16	25	397
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	15	17	382
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	14	17	358
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	12	15	308
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	7	11	288

	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*	20 kDa	73285	7	8	252
	Peptydylo-prolyl cis/trans izomeraza B	PPIB	*Gallus gallus*		22456	7	23	232
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	7	50	204
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1	*Gallus gallus*		84406	6	5	192
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	6	9	187
	Podjednostka β-5 proteasomu (fragment)	PSMB5	*Gallus gallus*		27256	4	9	159
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*		341740	3	1	156
	Białko szoku termicznego 70 kDa	HSP70	*Gallus gallus*		69936	3	6	156
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	2	4	116
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	2	4	104
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	2	4	104
	Peroksyredoksyna-6	PRDX6	*Gallus gallus*		25075	4	8	100
	Anhydraza węglanowa-2	CA2	*Gallus gallus*		29388	2	4	89
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	1	3	86
	Izomeraza triozofosforanowa	TPI1	*Gallus gallus*		26832	2	6	80
	Białko RAP1B z rodziny Ras	RAP1B	*Gallus gallus*		21040	1	6	80
	Peroksyredoksyna-1	PRDX1	*Gallus gallus*		22529	2	5	75
	Kinaza fosfoglicerynianowa	PGK	*Gallus gallus*		45087	1	3	65
	Białko wiążące osłonę przejrzystą 1	ZPBP1	*Gallus gallus*		36910	2	3	64
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	1	5	64
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	1	2	55
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	1	4	54
	Białko 14-3-3: Beta Epsilon Gamma Teta Zeta	 YWHAB YWHAE YWHAG YWHAQ YWHAZ	*Gallus gallus*		 28004 29326 28384 28050 27929	1	6	51
	GTPaza HRAS GTPaza NRAS	HRAS NRAS	*Gallus gallus*		21694 21550	1	4	47

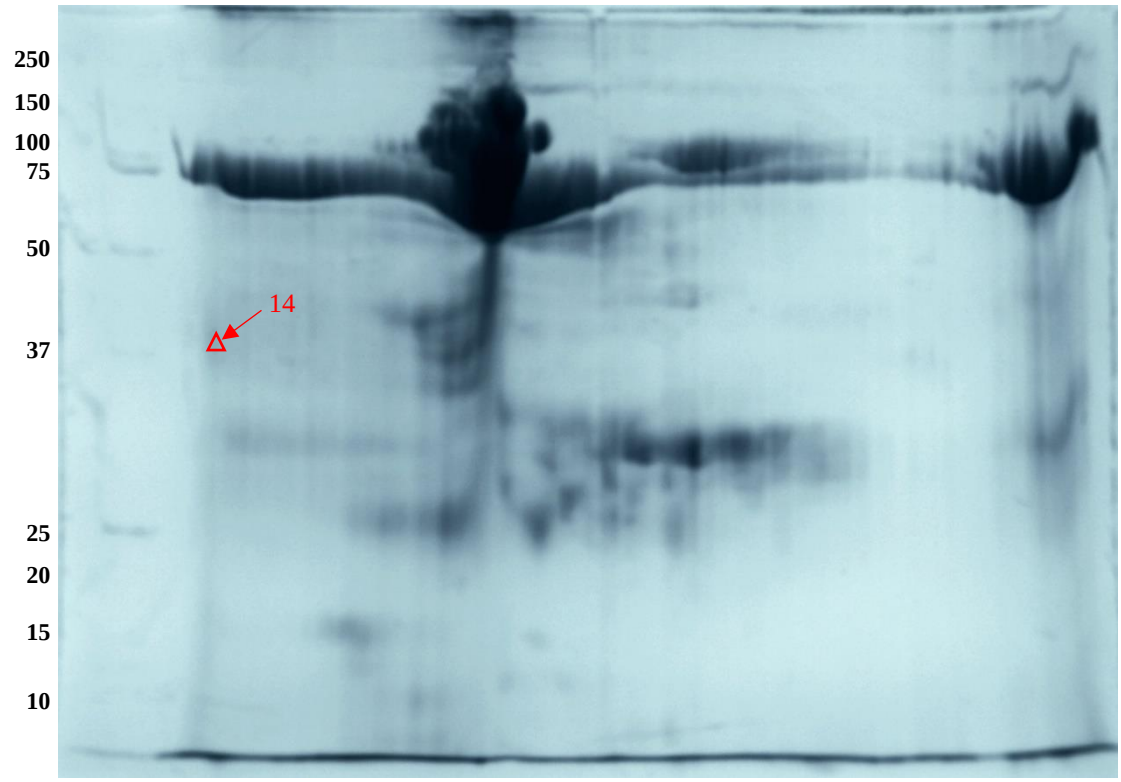
	Aldolaza C fruktozo-bisfosforanowa	ALDOC	*Gallus gallus*	20 kDa	14543	1	6	49
	Homolog białka 42 odpowiadającego za podziały komórkowe	CDC42	*Gallus gallus*		21601	1	10	45
12	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	16 kDa	71868	71	57	2803
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	16	25	894
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	18	14	714
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	6	15	450
	Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	*Gallus gallus*		83939	11	7	378
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	11	11	336
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	8	5	325
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	9	12	311
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	9	12	311
	Białko RAP1B z rodziny Ras	RAP1B	*Gallus gallus*		21040	9	13	303
	Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	*Gallus gallus*		341740	11	2	302
	Homolog białka 42 odpowiadającego za podziały komórkowe	CDC42	*Gallus gallus*		21601	8	25	225
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	5	11	194
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	3	5	192
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	7	12	191
	Białko szoku termicznego 70 kDa	HSP70	*Gallus gallus*		69936	7	10	181
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	5	8	169
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	3	6	135
	Peroksyredoksyna-6	PRDX6	*Gallus gallus*		25075	4	15	124
	Aneksyna A2	ANXA2	*Gallus gallus*		38901	3	4	116
	Perksyredoksyna-1	PRDX1	*Gallus gallus*		22529	4	18	112
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	2	9	107
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	2	4	106
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	2	6	103
	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*		73285	3	2	96
	Białko zeta 14-3-3	YWHAZ	*Gallus gallus*		27929	1	7	94

	Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną	RPS27A	*Gallus gallus*		18310	1	11	93
	Poliubikwityna B	UBB	*Gallus gallus*		34348	1	5	93
	Kofaktor NHE-RF1 regulujący wymianę jonów Na^+/H^+	SLC9A3R1	*Gallus gallus*		36011	2	4	92
	Deglikaza DJ-1 białek/kwasów nukleinowych	PARK7	*Gallus gallus*		20159	1	8	82
	Białko RAB10 z podrodziny Ras	RAB10	*Gallus gallus*		22763	2	5	80
	Izomeraza triozofosforanowa	TPI1	*Gallus gallus*		26832	2	10	80
	Anhydraza węglanowa-2	CA2	*Gallus gallus*		29388	2	4	75
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*		84406 83717	2	1	73
	GTPaza HRAS GTPaza NRAS	HRAS NRAS	*Gallus gallus*		21694 21550	1 1	6 6	47 47
	Białko NEL	NEL	*Gallus gallus*		96096	2	1	68
	Białko RAB2A z podrodziny Ras	RAB2A	*Gallus gallus*		23678	1	8	68
	Neuronalny czynnik regulujący NEGR1 (Neurotraktyna)	NEGR1	*Gallus gallus*		38434	2	3	67
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	1	8	61
	Fosfataza gamma białek tyrozynowych typu receptorowego	PTPRG	*Gallus gallus*		160750	1	3	57
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	1	2	55
	Aneksyna A1	ANXA1	*Gallus gallus*		14446	1	4	52
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	1	2	51
	Kinaza UMP/CMP	CMPK	*Gallus gallus*		22386	1	6	51
	Podjednostka zeta białka 1 T-kompleksu	CCT6	*Gallus gallus*		58008	1	2	50
	Białko Ran wiążące GTP	RAN	*Gallus gallus*		24583	1	6	49
	Białko RAB5B z podrodziny Ras	RAB5B	*Gallus gallus*		23828	1	6	45
13	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	56	57	2146
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	10	16	514
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	5	9	361
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	9	17	342
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	8	35	333
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	9	6	307
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	13	16	285
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	4	5	276
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	5	11	234
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	7	12	216
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	6	10	192
	Białko 4 wiążące retinol	RBP4	*Gallus gallus*		22843	5	25	188
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	3	3	134

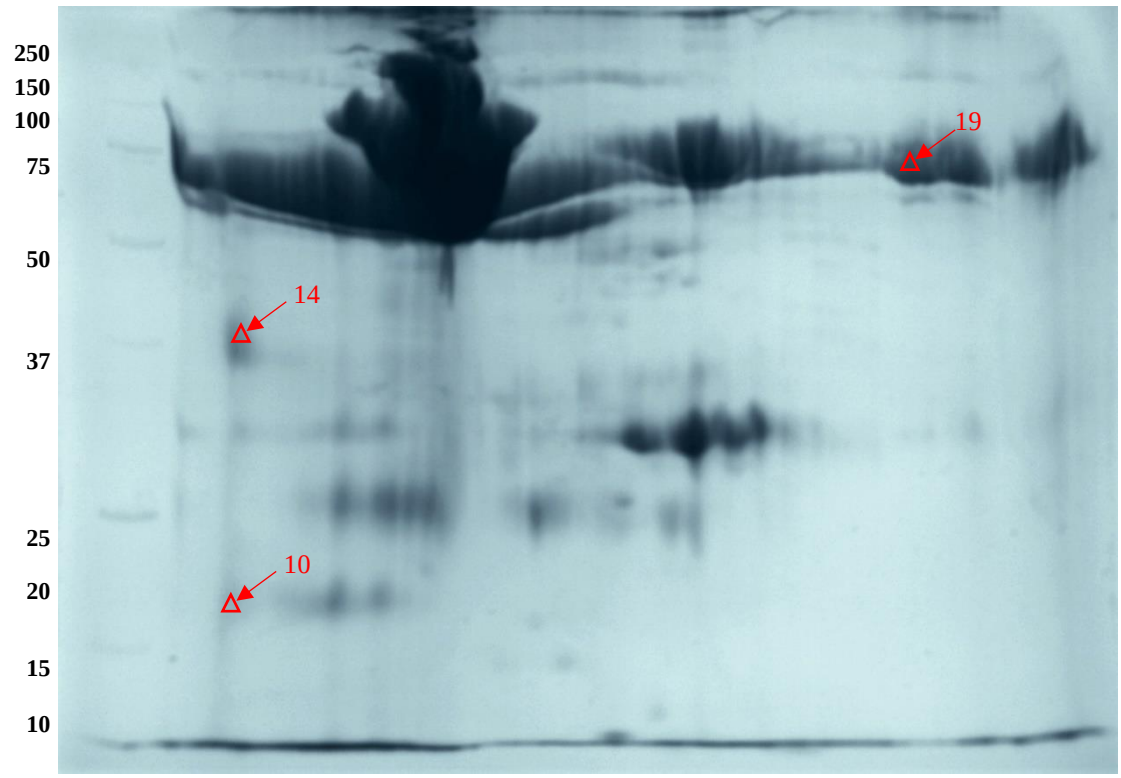
	Białko SPARC	SPARC	*Gallus gallus*		34894	2	9	121
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	3	6	98
	Awidyna	AVD	*Gallus gallus*		16872	2	7	91
	Kalmodulina	CALM CCM1	*Gallus gallus*	11 kDa	16827 16990	1	10	82
	Czynnik 5 ADP-rybozylacji	ARF5	*Gallus gallus*		20581	1	6	74
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	2	3	107
	Łańcuch ciężki ferrytyny	FTH	*Gallus gallus*		21249	1	6	64
	Katepsyna D	CTSD	*Gallus gallus*		43726	1	2	51
	Inhibitor 2 metaloproteinaz	TIMP2	*Gallus gallus*		24981	1	6	48
14	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	71	59	2878
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	56	67	2142
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	23	23	535
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	4	11	189
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	8	11	189
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	2	9	113
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	4	2	109
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	2	2	91
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*	7 kDa	84406 83717	2	9	86
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	1	5	84
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	2	4	78
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	2	4	78
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	2	4	65
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	1	1	61
	Łańcuch ciężki ferrytyny	FTH	*Gallus gallus*		21249	1	6	53
	Białko 4 wiążące retinol	RBP4	*Gallus gallus*		22843	1	5	48
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	1	1	47
	Kinaza difosforanów nukleozydów	NDK	*Gallus gallus*		17448	1	11	46

Analizę białek plazm nasienia przeprowadzono także z wykorzystaniem metody 2D-PAGE. W jej efekcie wybrano 8 frakcji białkowych, które poddano identyfikacji przy pomocy spektrometrii MALDI-TOF/TOF **(Rycina 4.15, Rycina 4.16, Rycina 4.17, Rycina 4.18)**. Podstawą wyboru białek były średnie wartości gęstości optycznych frakcji białkowych **(Tabela 4.76, Tabela 4.77)**. Trzeba podkreślić, że opisywana metoda przysporzyła najwięcej trudności. W przypadku białek pełnej plazmy nasienia występowała zdecydowana dominacja pewnych rodzajów białek, widoczna zwłaszcza w plazmach nasienia żółtego. W grupie wspomnianych białek występuje m.in. albumina (~70 kDa), która zdecydowanie dominuje w plazmie nasienia ptaków **(Rycina 4.11, Rycina 4.12, Rycina 4.13, Rycina 4.14)**. Białko dominowało na elektroforegramach nie pozwalając na skuteczny rozdział pozostałych frakcje polipeptydowych. Kolejne podejmowane próby zmiany ilości nanoszonego białka czy warunków rozdziału nie przynosiły zadowalających rezultatów. Mimo wszystko rozdział 2D-PAGE białek plazmowych był łatwiejszy do przeprowadzenia niż plemnikowych.

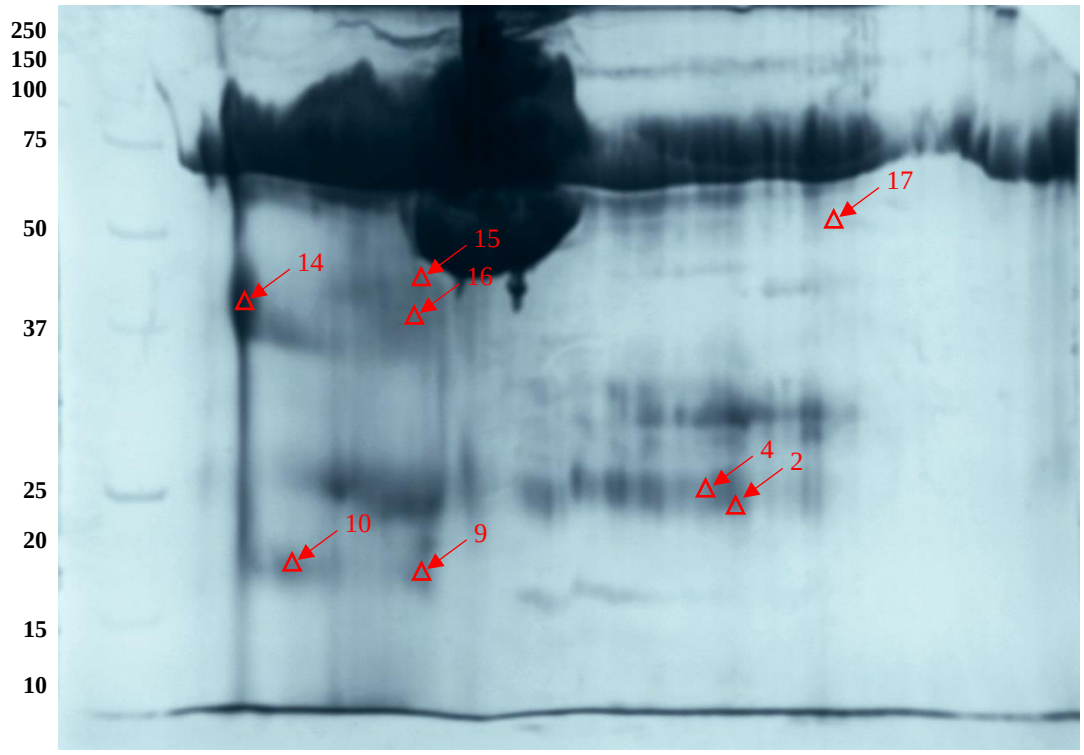
Wyniki identyfikacji wyizolowanych fosfoprotein plazm nasienia indora za pomocą spektrometrii mas metodą MALDI-TOF/TOF zostały umieszczone w **Tabeli 4.78**.



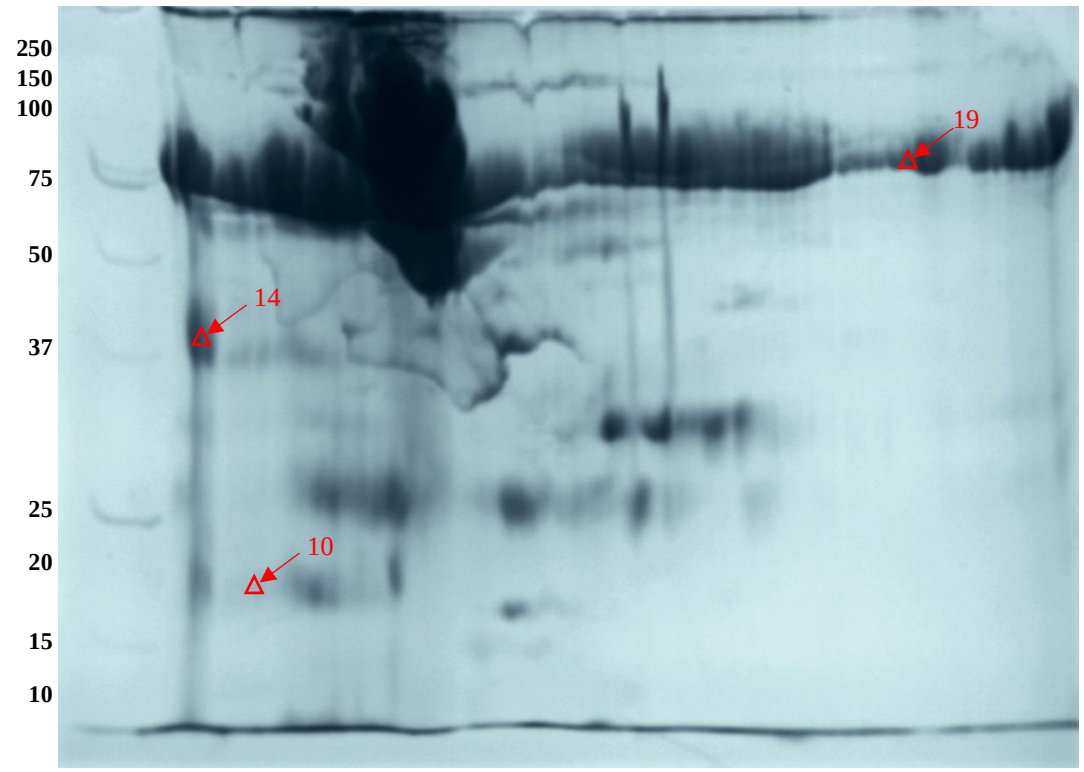
Rycina 4.11 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim
14 – 39,7 kDa, pI 3,41



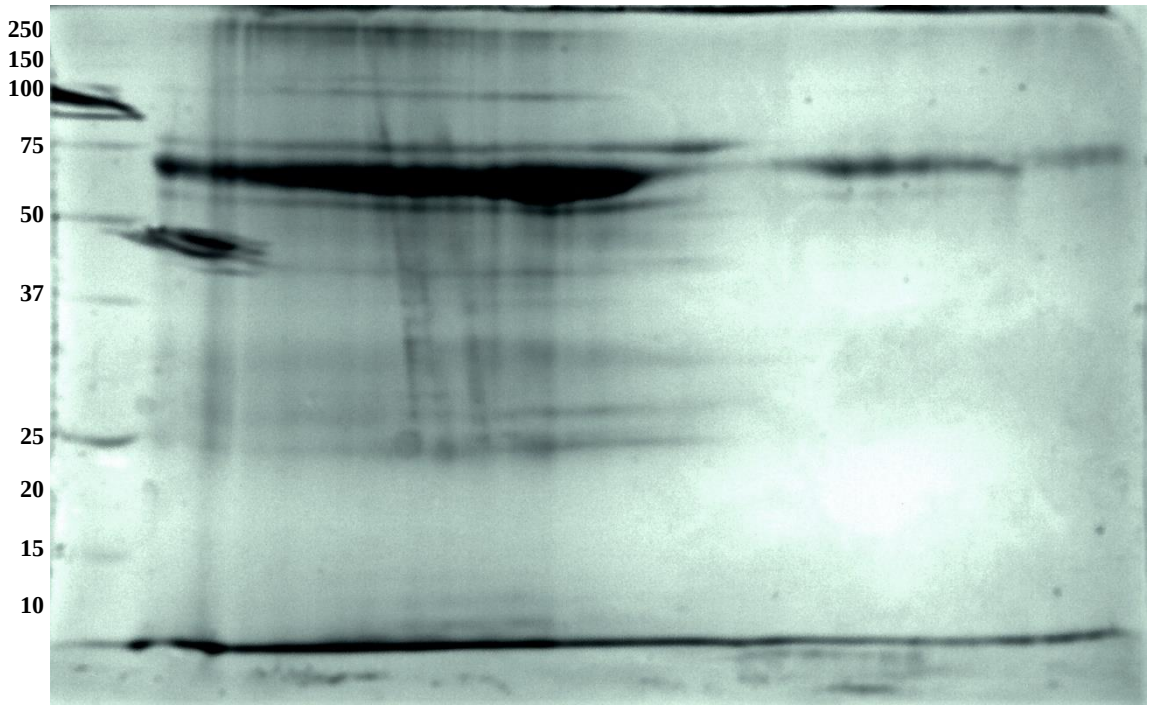
Rycina 4.12 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia białego w sezonie jesienno-zimowym
10 – 19,5 kDa, pI 3,86; 14 – 39,7 kDa, pI 3,41; 19 – 72,1 kDa, pI 8,17



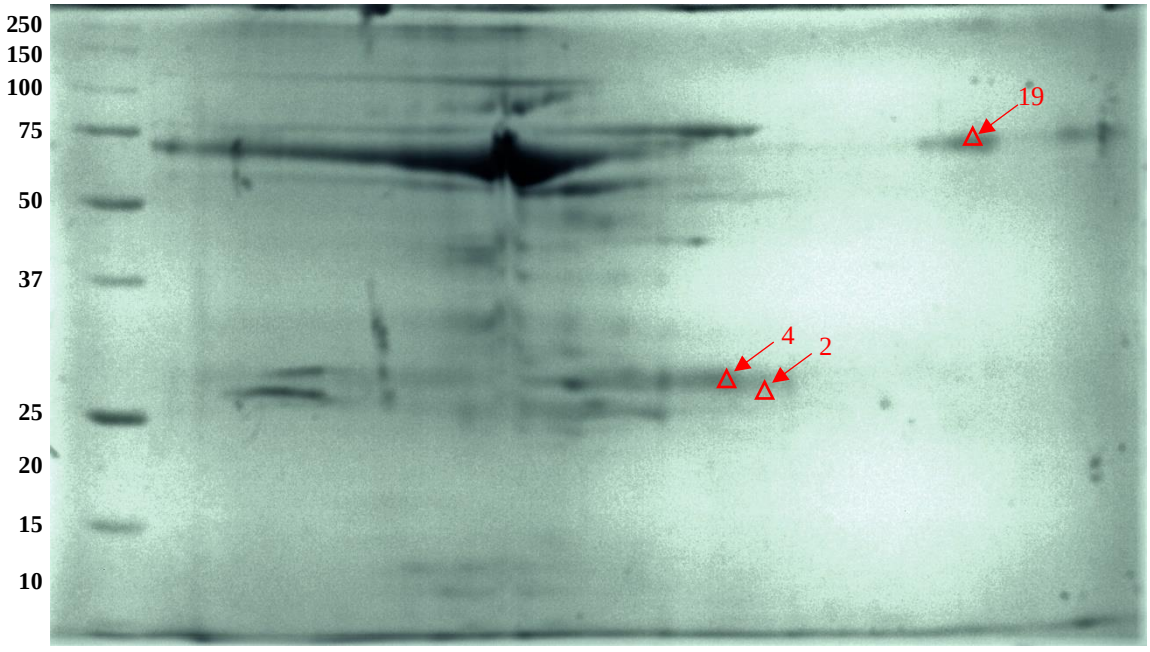
Rycina 4.13 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia żółtego w sezonie wiosenno-letnim
2 – 25,7 kDa, pI 7,72; 4 – 26,0 kDa, pI 7,19; 9 – 18,0 kDa, pI 4,83; 10 – 19,5 kDa, pI 3,86; 14 – 39,7 kDa, pI 3,41; 15 – 42,9 kDa, pI 4,40; 16 – 38,2, pI 4,37; 17 – 53 kDa, pI 7,87



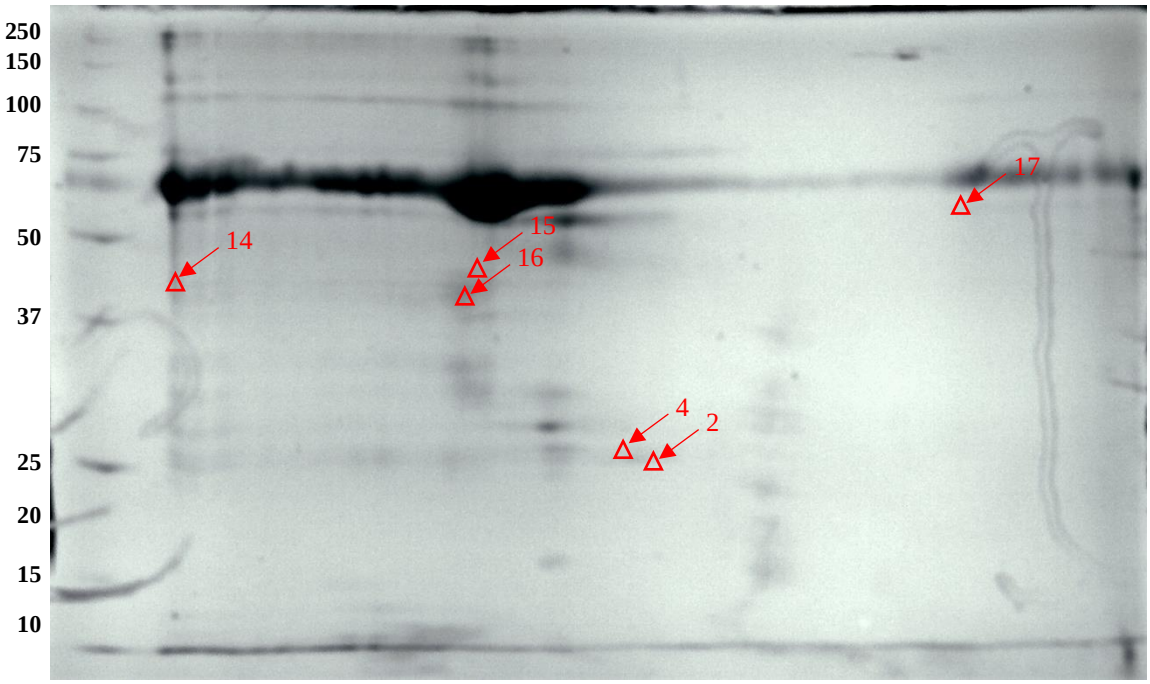
Rycina 4.14 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia żółtego w sezonie jesienno-zimowym
10 – 19,5 kDa, pI 3,86; 14 – 39,7 kDa, pI 3,41; 19 – 72,1 kDa, pI 8,17



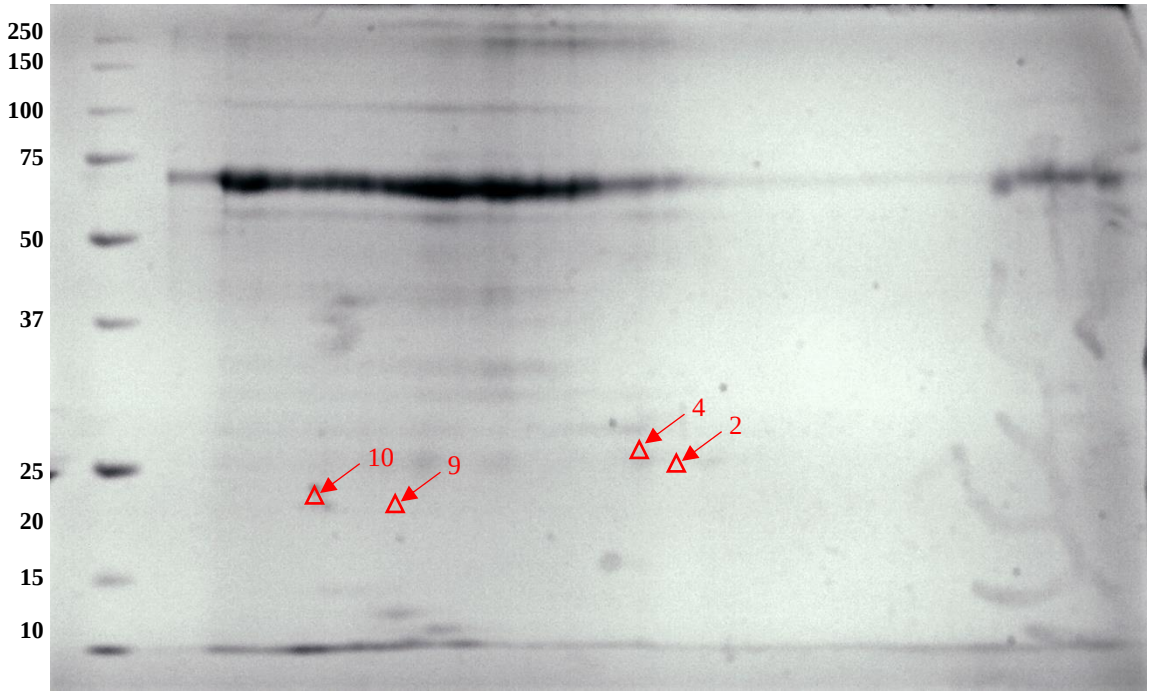
Rycina 4.15 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy białego nasienia w sezonie wiosenno-letnim



Rycina 4.16 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy białego nasienia w sezonie jesienno-zimowym
2 – 25,7 kDa, pI 7,72; 4 – 26,0 kDa, pI 7,19; 19 – 72,1 kDa, pI 8,17



Rycina 4.17 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy żółtego nasienia w sezonie wiosenno-letnim
2 – 25,7 kDa, pI 7,72; 4 – 26,0 kDa, pI 7,19; 14 – 39,7 kDa, pI 3,41; 15 – 42,9 kDa, pI 4,40; 16 – 38,2, pI 4,37; 17 – 53 kDa, pI 7,87



Rycina 4.18 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy żółtego nasienia w sezonie jesienno-zimowym
2 – 25,7 kDa, pI 7,72; 4 – 26,0 kDa, pI 7,19; 9 – 18,0 kDa, pI 4,83; 10 – 19,5 kDa, pI 3,86;

Tabela 4.76 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów

Białko	Plazmy białe	Plazmy żółte
2	0,10	0,08
4	0,13	0,11
14	0,04	0,11
16	0,56	0,28
19	0,10	0,35

Tabela 4.77 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm nasienia pobranych w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia

Białko	Sezon wiosenno-letni	Sezon jesienno-zimowy
2	0,11	0,08
4	0,14	0,10
9	0,12	0,06
10	0,10	0,05
14	0,10	0,04
16	0,47	0,37
17	0,09	0,03
19	0,33	0,12

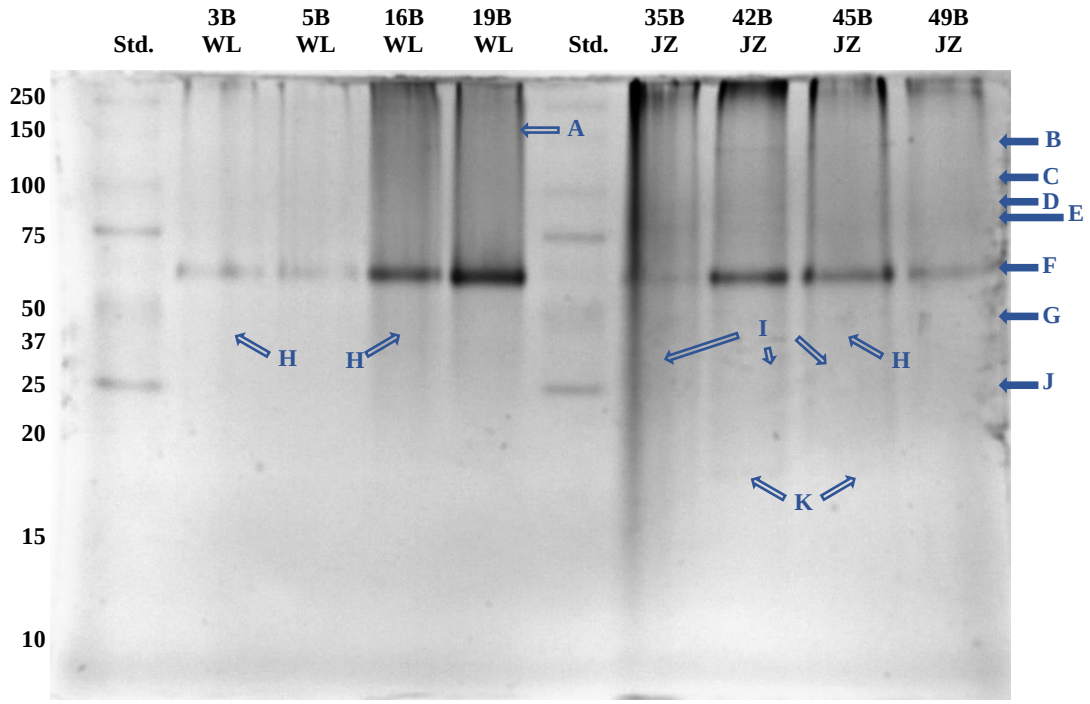
Tabela 4.78 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z plazm nasienia uzyskanych metodami 2D-PAGE oraz MALDI-TOF/TOF

Nr	Zidentyfikowane białko	Gen kodujący	Gatunek	Masa wg PDQuest	Masa wg MASCOT [Da]	Liczba unikalnych peptydów	Score
2	Łańcuch lekki immunoglobuliny ze stałym regionem	IGLC3	*Meleagris gallopavo*	25 700	11 567	2	118
4	Łańcuch C immunoglobuliny lambda, izoforma X2	LAC	*Meleagris gallopavo*	26 000	27 892	2	187
9	Apolipoproteina A1	APOA1	*Meleagris gallopavo*	18 000	30 593	6	300
10	Podobny do SSC5D rozpuszczalny receptor nekrofagotyczny zawierający domenę bogatą w cysteinę	SSC5D	*Meleagris gallopavo*	19 500	54 032	1	201
14	Białko podobne do alfa-1 kwaśnej glikoproteiny 2	ORM2	*Meleagris gallopavo*	39 700	22 369	2	203
15	Albumina	ALB	*Meleagris gallopavo*	42 900	71 740	4	171
16	Albumina	ALB	*Meleagris gallopavo*	35 200	71 740	5	264
17	Kinaza keratynowa podtyp B	CKB	*Meleagris gallopavo*	53 000	42 982	2	124
19	Albumina	ALB	*Meleagris gallopavo*	72 100	71 740	3	250

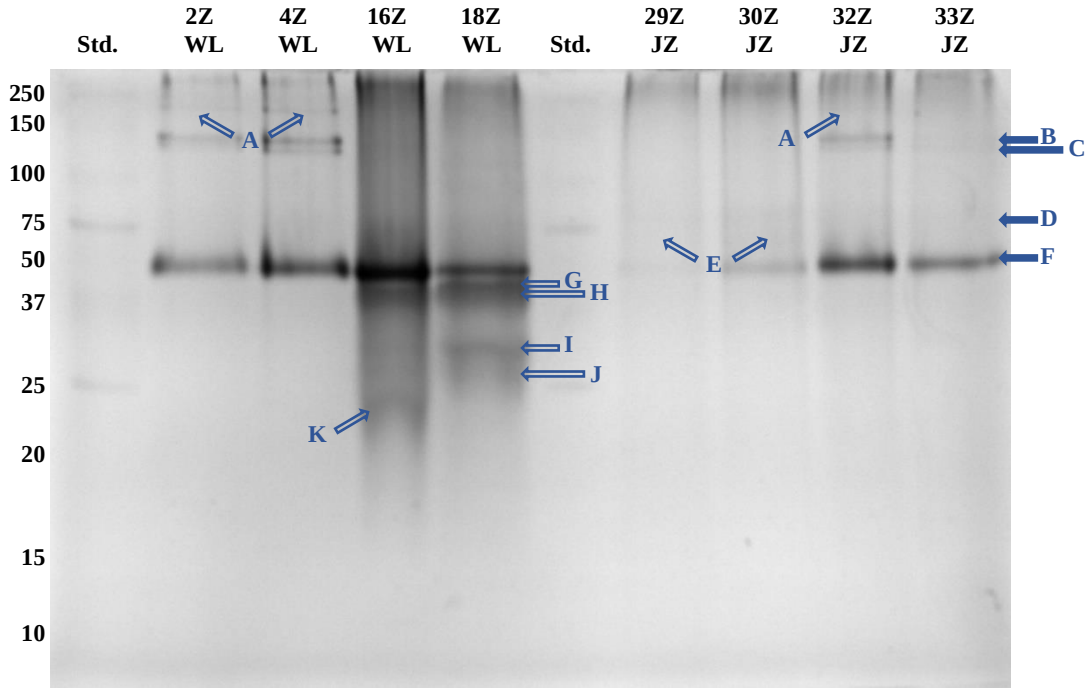
* score istotny statystycznie wynosi >60

4.6. Analiza elektroforegramów fosfoprotein izolowanych z ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych i żółtych ejakulatów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodami Native-PAGE, Tricine-PAGE, oraz Urea-PAGE

Analizie profili proteomicznych poddano również ekstrakty plemnikowe z białego i żółtego nasienia pochodzące z obu wyróżnionych sezonów. Elektroforegramy uzyskane metodą Native-PAGE przedstawiono poniżej **(Rycina 4.19, Rycina 4.20)**. W plemnikach z nasienia białego wykryto 12 frakcji białkowych, z których tylko jedna o masie 62 kDa obecna była we wszystkich badanych próbach. Frakcje o masach 138 (B) i 49 kDa (G) były charakterystyczne dla sezonu JZ, a to o masie 147 kDa (A) dla WL w plemnikach z nasienia białego **(Rycina 4.19, Tabela 4.79)**. Z kolei w plemnikach z nasienia żółtego wykryto 11 frakcji białkowych z czego jedna o masie cząsteczkowej 49 kDa była obecna we wszystkich próbach. Na podstawie uzyskanych rozdziałów niemożliwym było wskazanie frakcji fosfoproteinowych charakterystycznych dla danego sezonu w plemnikach z żółtego nasienia **(Rycina 4.20, Tabela 4.80)**. Białko o masie 49 kDa występowało u wszystkich osobników z syndromem żółtego nasienia niezależnie od sezonu rozrodczego, jednak było obecne również w ekstraktach białych w sezonie JZ **(Rycina 4.19, Rycina 4.20, Tabela 4.79, Tabela 4.80)**.



Rycina 4.19 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych z białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE



Rycina 4.20 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych z białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE

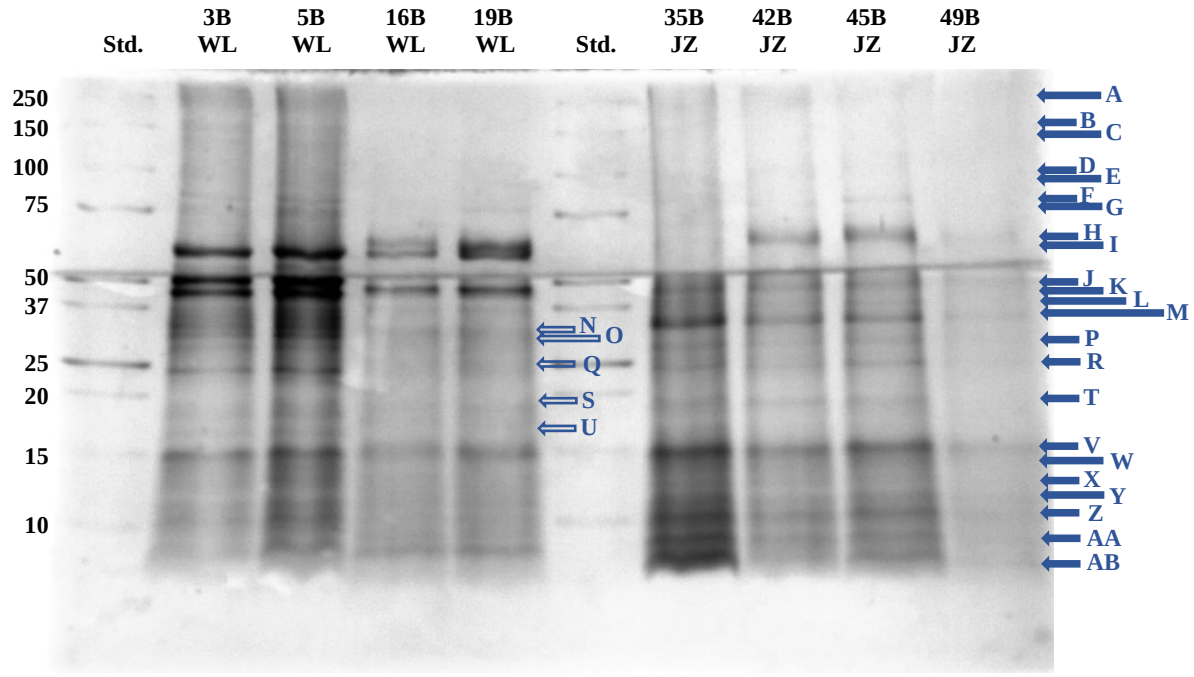
Tabela 4.79 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]										
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**
Lp.	**147**	**138**	**106**	**82**	**75**	**62**	**49**	**38**	**32**	**25**	**22**
3B WL	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
5B WL	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
16B WL	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
19B WL	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
35B JZ	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
42B JZ	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
45B JZ	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
49B JZ	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-

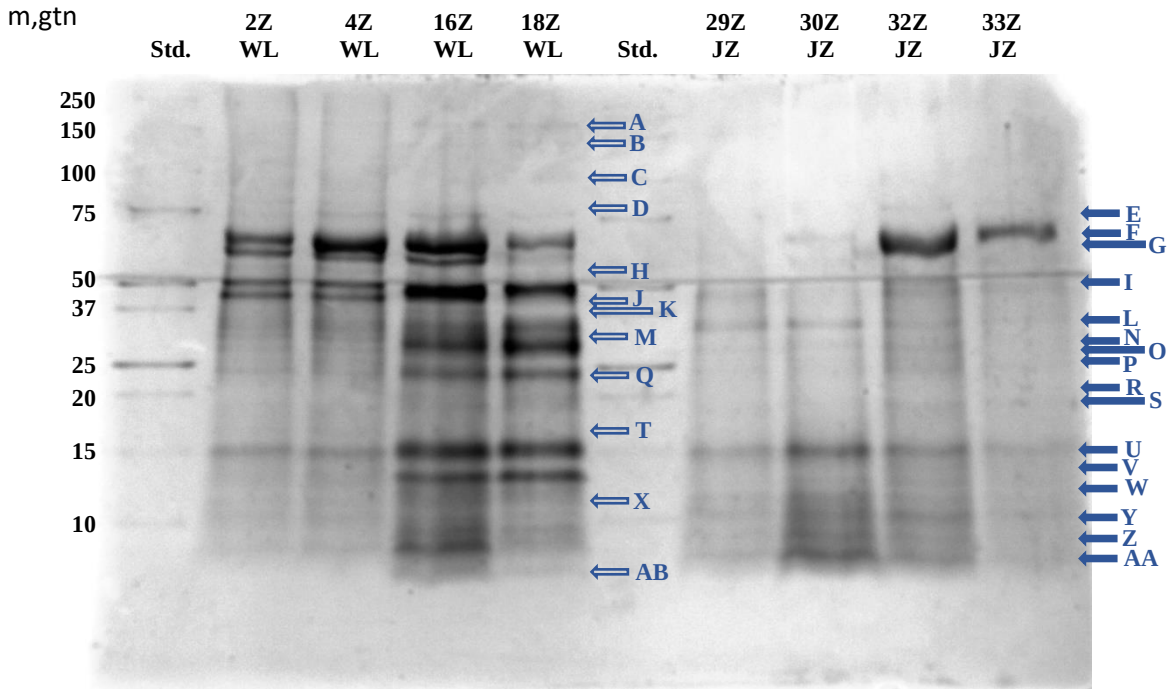
Tabela 4.80 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]										
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**
Lp.	**210**	**143**	**127**	**75**	**69**	**49**	**43**	**38**	**32**	**25**	**22**
2Z WL	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
4Z WL	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
16Z WL	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
18Z WL	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
29Z JZ	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
30Z JZ	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
32Z JZ	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
33Z JZ	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

Profile fosfoproteinowe ekstraktów plemnikowych uzyskane metodą Tricine-PAGE wykazały obecność trzech niskocząsteczkowych frakcji białkowych o masach 27, 15 i 10 kDa **(Rycina 4.21, Rycina 4.22, Tabela 4.81, Tabela 4.82)** niezależnie od sezonu czy rodzaju nasienia. Na elektroforegramach ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego nasienia zaobserwowano łącznie 28 frakcji, z których dziesięć występowało u wszystkich osobników niezależnie od badanego sezonu. Miały one masy równe 44, 37, 27, 23, 17, 15, 13, 12, 10 i 8 kDa. W tej grupie charakterystyczne dla sezonu WL były białka o masach 57 (I), 32 (N), 30 (O) oraz 16 kDa (U), a dla sezonu JZ jedno białko - 5 kDa (AB) **(Rycina 4.21, Tabela 4.81)**. Natomiast na elektroforegramach ekstraktów plemnikowych z żółtego nasienia rozpoznano również łącznie 28 frakcji białkowych. Frakcje o masach cząsteczkowych równych 50, 35, 27, 26, 25, 18, 15, 14, 11 oraz 10 kDa występowały we wszystkich próbach niezależnie od sezonu. Charakterystyczne dla sezonu WL, w nasieniu z syndromem YSS, były frakcje o masach 165 (A), 138 (B), 107 (C), 80 (D), 52 (H), 44 (J), 37 (K), 32 (M), 23 (Q), 17 (T), 12 (X) oraz 5 kDa (AB), a dla sezonu JZ – 13 kDa (W) **(Rycina 4.22, Tabela 4.82)**. Frakcjami białkowymi charakterystycznymi dla sezonu WL, bez względu na rodzaj nasienia, z którego pochodziły badane plemniki, były te o masach 138 i 32 kDa, a dla sezonu JZ nie znaleziono takich zależności **(Rycina 4.21, Rycina 4.22, Tabela 4.81, Tabela 4.82)**. W plemnikach pochodzących z nasienia żółtego wykryto trzy białka, które były obecne również w plemnikach nasienia białego podczas sezonu WL. Były to białka o masach równych 50, 25 i 18 kDa. Z kolei pięć innych białek występowało w plemnikach z białego nasienia, ale było obecne również w próbach plemników żółtego nasienia podczas sezonu WL – 44, 37, 23, 17 i 12 kDa, a podczas sezonu JZ można było znaleźć dwie inne niskocząsteczkowe frakcje o masach 13 i 8 kDa **(Rycina 4.21, Rycina 4.22, Tabela 4.81, Tabela 4.82)**. Frakcjami występującymi jedynie w próbach ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego nasienia podczas sezonu WL były te o masach cząsteczkowych równych 57 (I), 30 (O) oraz 16 kDa (U) . Z kolei w plemnikach z nasienia tego samego rodzaju podczas sezonu JZ można było zauważyć frakcję o masie 5 kDa (AB) **(Rycina 4.21, Tabela 4.81)**. Charakterystyczne dla ekstraktów plemnikowych z żółtego nasienia podczas sezonu wiosenno-letniego były frakcje białkowe o masach równych 165 (A), 107 (C) oraz 52 kDa (H), a podczas sezonu jesienno-zimowego niskocząsteczkowe białko o masie 20 kDa (R) **(Rycina 4.22, Tabela 4.82)**.



Rycina 4.21 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Tricine-PAGE



Rycina 4.22 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Tricine-PAGE

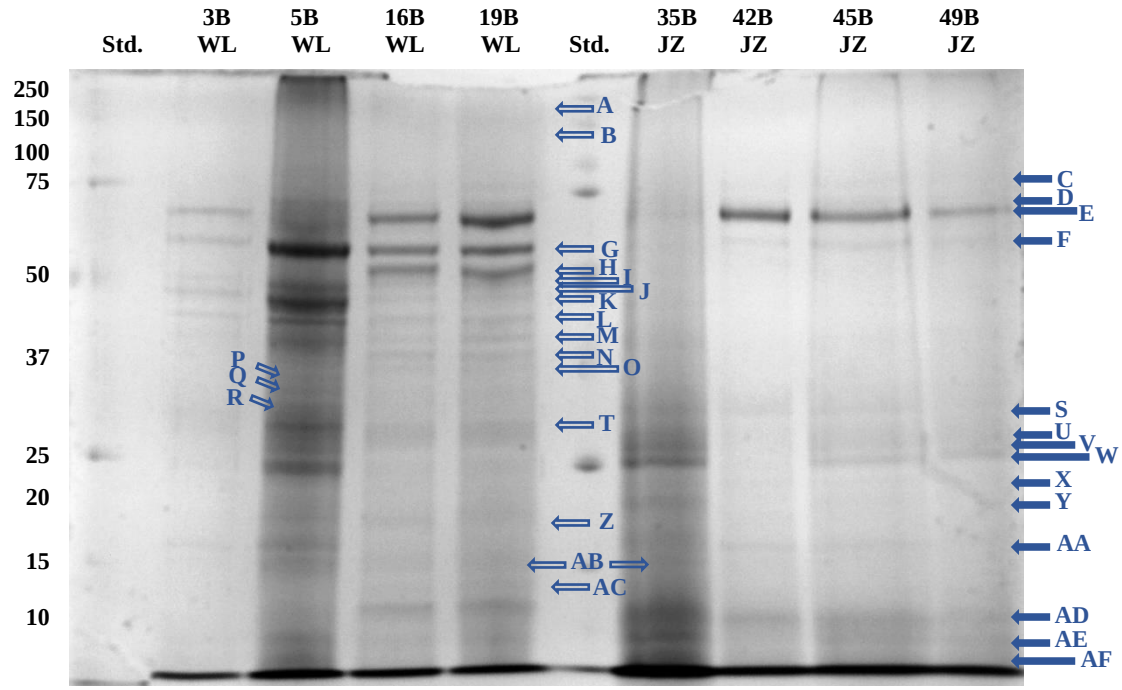
Tabela 4.81 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]																										
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**	**W**	**X**	**Y**	**Z**	**AA**	**AB**
Lp.	**223**	**165**	**138**	**98**	**78**	**76**	**75**	**63**	**57**	**50**	**44**	**37**	**35**	**32**	**30**	**27**	**25**	**23**	**18**	**17**	**16**	**15**	**14**	**13**	**12**	**10**	**8**	**5**
3B WL	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5B WL	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16B WL	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
19B WL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
35B JZ	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
42B JZ	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
45B JZ	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
49B JZ	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+

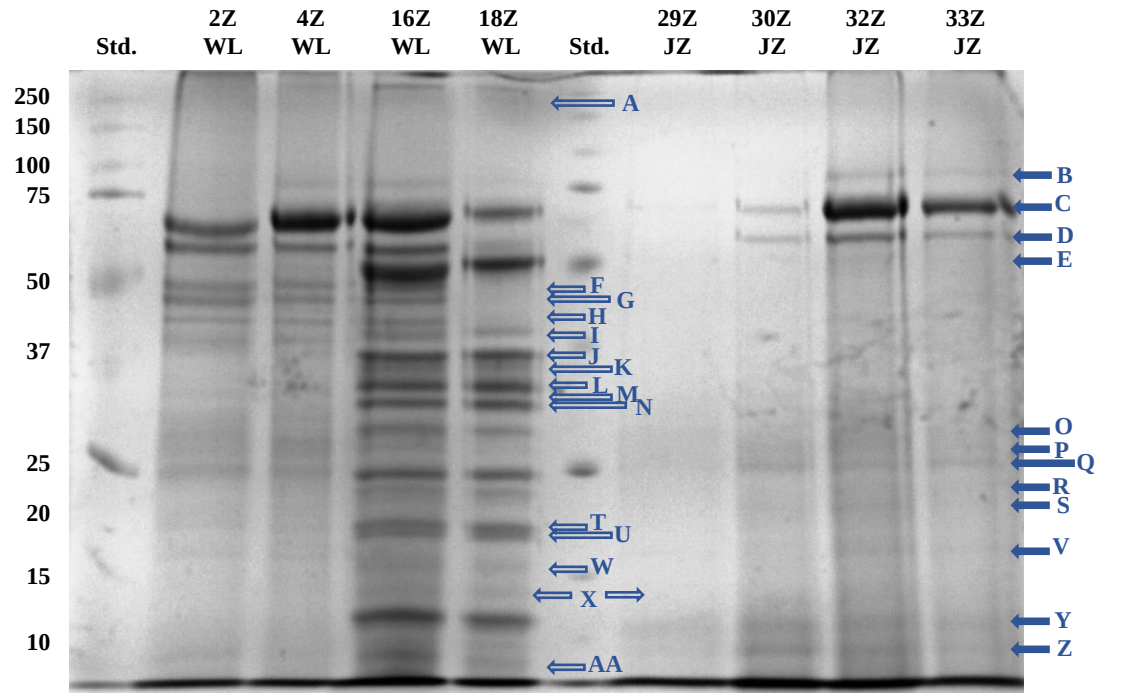
Tabela 4.82 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]																										
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**	**W**	**X**	**Y**	**Z**	**AA**	**AB**
Lp.	**165**	**138**	**107**	**80**	**72**	**63**	**54**	**52**	**50**	**44**	**37**	**35**	**32**	**27**	**26**	**25**	**23**	**20**	**18**	**17**	**15**	**14**	**13**	**12**	**11**	**10**	**8**	**5**
2Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
4Z WL	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
16Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
18Z WL	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
29Z JZ	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
30Z JZ	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
32Z JZ	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
33Z JZ	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-

Profile fosfoproteinowe białek plemnikowych białego nasienia zawierały 32 frakcje białkowe, z których jedynie dwie były widoczne we wszystkich badanych ekstraktach w tej grupie ejakulatów. Miały one masy cząsteczkowe równe 9 i 5 kDa i należały do niskocząsteczkowych białek. Charakterystycznymi dla sezonu wiosenno-letniego w tej były białka o masach 225 (A), 143 (B), 54 (G), 52 (H), 51 (I), 49 (J), 48 (K), 46 (L), 43 (M), 39 (N), 36 (O), 27 (T), 18 (Z), 15 (AB) i 12 kDa (AC), a podczas sezonu jesienno-zimowego jedynie białko o masie 58 kDa (F) wykazywało takie właściwości **(Rycina 4.23, Tabela 4.83)**. Po przeanalizowaniu profili ekstraktów plemnikowych w grupie żółtych ejakulatów zlokalizowano łącznie 27 frakcji białkowych, z których sześć było widoczna we wszystkich próbach. Były to białka o masach równych 65, 54, 51, 27, 25 oraz 17 kDa. Sezon jesienno-zimowy nie charakteryzował się żadnymi swoistymi białkami, natomiast sezon wiosenno-letni obecnością białek o masach – 198 (A), 49 (F), 48 (G), 43 (H), 39 (I), 36 (J), 34 (K), 32 (L), 29 (M), 28 (N), 19 (T), 18 (U), 16 (W) oraz 9 kDa (AA) **(Rycina 4.24, Tabela 4.84)**. Frakcjami występującymi wyłącznie w sezonie wiosenno-letnim, bez względu na rodzaj nasienia, były 49, 48, 43, 39, 36, 34, 32, 29 i 18 kDa, natomiast charakterystyczną dla drugiego sezonu była jedynie frakcja o masie 22 kDa **(Rycina 4.24, Rycina 4.25, Tabela 4.83, Tabela 4.84)**. Białkami występującymi głównie w plemnikach z nasienia żółtego, ale znajdowanymi również w plemnikach z nasienia białego podczas sezonu WL były te o masach 54, 51, 27 oraz 12 kDa, a występującymi również w nasieniu białym w sezonie JZ – 25, 20 i 10 kDa. Z kolei frakcje występujące głownie w plemnikach nasienia białego, ale zauważane również w plemnikach żółtych z sezonu wiosenno-letniego były dwa białka – 16 oraz 9 kDa **(Rycina 4.23, Rycina 4.24, Tabela 4.83, Tabela 4.84)**. Charakterystyczne dla plemników z pochodzących z nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim są frakcje białkowe o masach równych 225 (A), 143 (B), 52 (H), 46 (L) oraz 15 kDa (AB) **(Rycina 4.23, Tabela 4.83)**, a dla plemników z żółtego nasienia w tym samym okresie – 198 (A) i 19 kDa (T) **(Rycina 4.24, Tabela 4.84)**.



Rycina 4.23 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Urea-PAGE



Rycina 4.24 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Urea-PAGE

Tabela 4.83 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]																													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF
Lp.	225	143	75	72	65	58	54	52	51	49	48	46	43	39	36	34	32	29	28	27	26	25	24	22	20	18	16	15	12	10	9	5
3B WL	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
5B WL	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
16B WL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
19B WL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
10B JZ	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
17B JZ	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
20B JZ	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
29B JZ	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Tabela 4.84 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE

	Masy cząsteczkowe [kDa]																											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA
Lp.	198	87	65	54	51	49	48	43	39	36	34	32	29	28	27	26	25	22	20	19	18	17	16	13	12	10	9
2Z WL	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
4Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
16Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18Z WL	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29Z JZ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
30Z JZ	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
32Z JZ	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
33Z JZ	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-

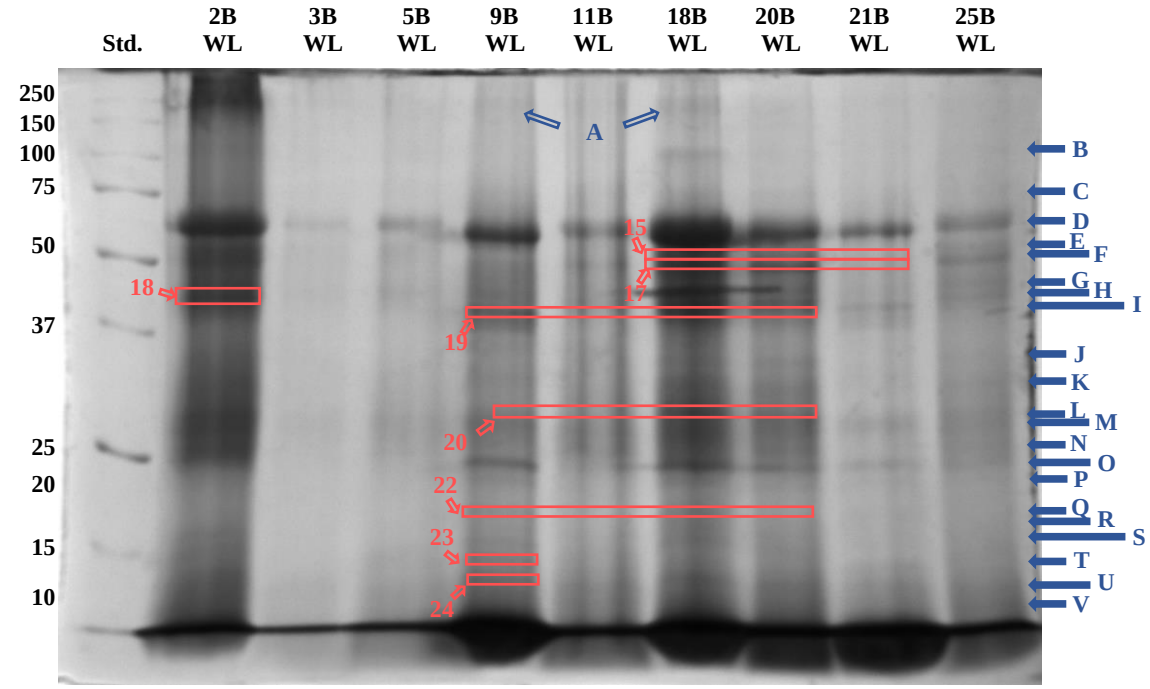
4.7. Identyfikacja fosfoprotein ekstraktów plemnikowych białego i żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym metodami spektrometrii mas na podstawie elektroforegramów uzyskanych metodami SDS-PAGE i 2D-PAGE

Tak jak w przypadku plazm nasienia, przeprowadzono rozdziały elektroforetyczne metodami SDS-PAGE i 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych nasienia białego i żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym, które następnie wykorzystano do spektrometrycznej identyfikacji białek.

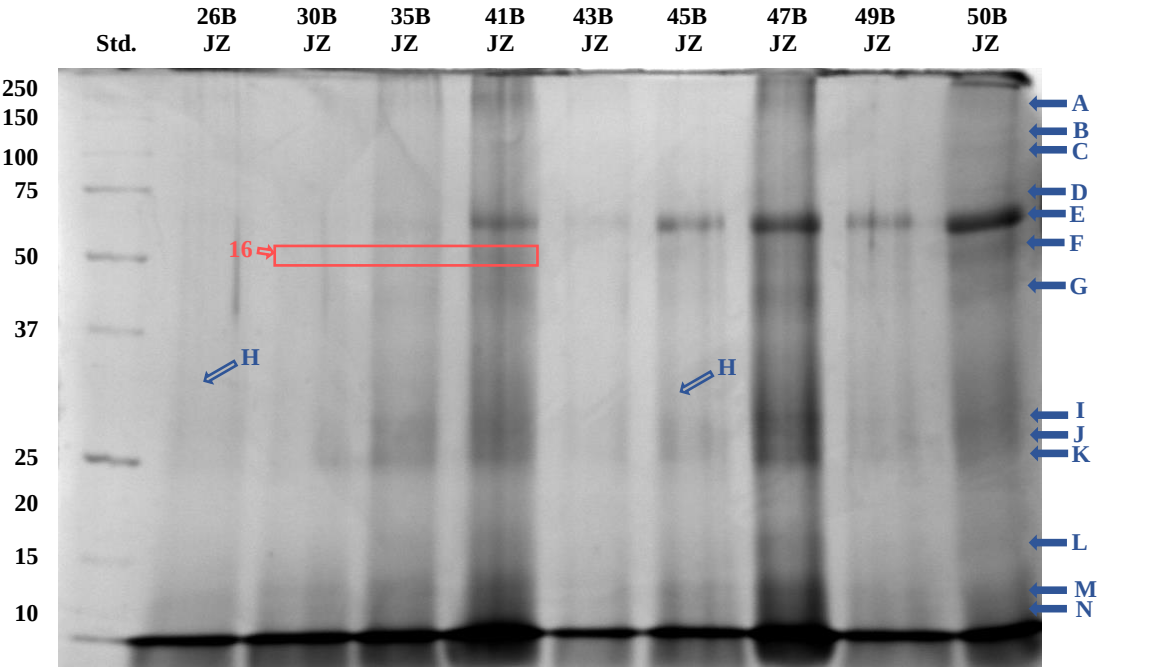
W profilach fosfoproteinowych ekstraktów plemnikowych jedynie frakcja o masie 58 kDa występowała w proteomie każdego osobnika **(Rycina 4.25, Rycina 4.26, Rycina 4.27, Rycina 4.28, Tabela 4.85, Tabela 4.86, Tabela 4.87, Tabela 4.88)**. Białkami charakterystycznymi dla ekstraktów plemnikowych z białego nasienia, niezależnie od pory roku, były te o masach cząsteczkowej równych 126, 52, 51, 41, 35, 28, 26 i 17 kDa **(Rycina 4.25, Rycina 4.26, Tabela 4.85, Tabela 4.86)**, a żółtych 237, 176, 147, 135, 100, 75, 55, 47, 38, 33, 31 i 21 kDa **(Rycina 4.27, Rycina 4.28, Tabela 4.87, Tabela 4.88)**. Z kolei po wzięciu pod uwagę okresu pobrania nasienia, wykazano, że frakcje białkowe charakterystyczne dla sezonu wiosenno-letniego miały masy 237, 147, 100, 75, 55, 47, 41, 40, 35, 33, 29, 23, 18, 17, 15 i 13 kDa **(Rycina 4.25, Rycina 4.27, Tabela 4.85, Tabela 4.87).** W sezonie jesienno-zimowym były to te o masach 176, 135, 51 i 28 kDa **(Rycina 4.26, Rycina 4.28, Tabela 4.86, Tabela 4.88)**. Dwa białka wysokocząsteczkowe o masach 246 i 105 kDa obserwowano zarówno w białych plemnikach i niezależnie od sezonu jak i w żółtych plemnikach podczas sezonu jesienno-zimowego. Dwie kolejne frakcje występowały w plemnikach nasienia żółtego niezależnie od pory roku z czego jedna była obecna również w plemnikach białych w sezonie WL – 49 kDa, a druga o masie 11 kDa w plemnikach białych, ale w sezonie JZ **(Rycina 4.25, Rycina 4.26, Rycina 4.27, Rycina 4.28, Tabela 4.85, Tabela 4.86, Tabela 4.87, Tabela 4.88)**. Charakterystyczne dla plemników z białego nasienia w sezonie wiosenno-letnim były polipeptydy o masach cząsteczkowych równych 71 (C), 41 (H), 40 (I), 35 (J) oraz 17 kDa (R) **(Rycina 4.25, Tabela 4.85)**, a dla tych pobranych podczas sezonu jesienno-zimowego białko o masie 126 kDa (B) **(Rycina 4.26, Tabela 4.86)**. Z kolei rozdział białek plemników z nasienia z YSS podczas sezonu wiosenno-letniego uwidaczniał frakcje o masach 237 (A), 147 (B), 100 (C), 75 (D) i 33 kDa (M) **(Rycina 4.27, Tabela 4.87)**, natomiast podczas chłodniejszego okresu - białka o masach 176 (B) i 135 kDa (C) **(Rycina 4.28, Tabela 4.88)**. Czerwonymi ramkami

oznaczono prążki, które zostały poddane identyfikacji metodą spektrometrii mas Nano LC-MS/MS **(Rycina 4.25, Rycina 4.26, Rycina 4.27)**.

Potwierdzeniem różnic występujących pomiędzy danymi grupami są średnie wartości gęstości optycznych (OD) poszczególnych prążków przedstawione poniżej **(Tabela 4.89, Tabela 4.90)**. Wyniki identyfikacji wyizolowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia indora za pomocą spektrometrii mas Nano LC-MS/MS zostały umieszczone w **Tabeli 4.91**.



Rycina 4.25 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białego nasienia indorów w sezonie wiosenno-letnim uzyskany metodą SDS-PAGE



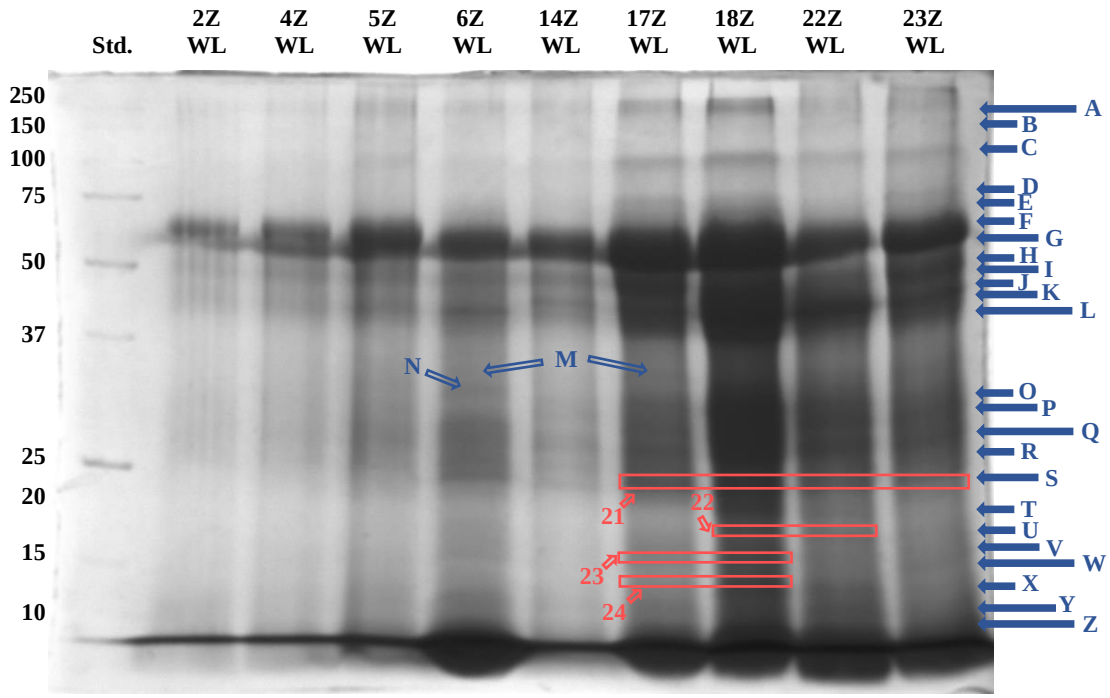
Rycina 4.26 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym uzyskany metodą SDS-PAGE

Tabela 4.85 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonie wiosenno-letnim

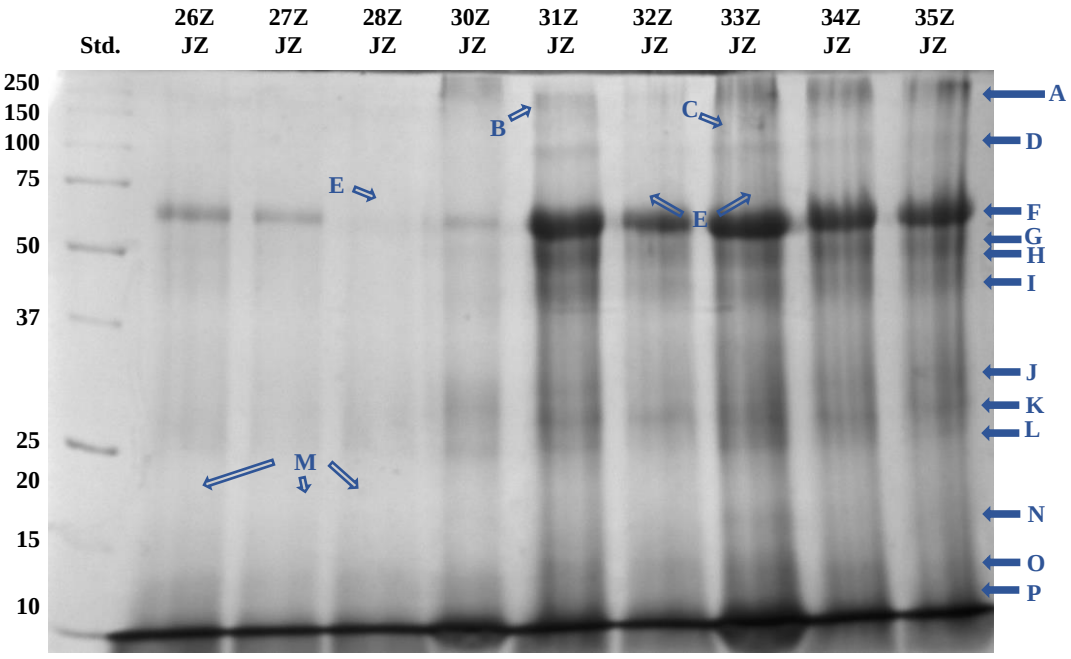
	Masy cząsteczkowe [kDa]																				
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**
Lp.	**246**	**106**	**71**	**58**	**52**	**49**	**43**	**41**	**40**	**35**	**32**	**29**	**27**	**26**	**25**	**23**	**18**	**17**	**16**	**15**	**13**	**9**
2B WL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
3B WL	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5B WL	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
9B WL	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11B WL	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
18B WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20B WL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
21B WL	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
25B WL	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

Tabela 4.86 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]													
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**
Lp.	**246**	**126**	**106**	**71**	**58**	**51**	**43**	**32**	**28**	**26**	**25**	**16**	**11**	**9**
26B JZ	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
30B JZ	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
35B JZ	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
41B JZ	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
43B JZ	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
45B JZ	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
47B JZ	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
49B JZ	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
50B JZ	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-



Rycina 4.27 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie wiosenno-letnim uzyskany metodą SDS-PAGE



Rycina 4.28 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym uzyskany metodą SDS-PAGE

Tabela 4.87 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie wiosenno-letnim

	Masy cząsteczkowe [kDa]																								
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**	**U**	**V**	**W**	**X**	**Y**	**Z**
Lp.	**237**	**147**	**100**	**75**	**71**	**58**	**55**	**49**	**47**	**43**	**40**	**38**	**33**	**32**	**31**	**29**	**27**	**25**	**23**	**21**	**18**	**16**	**15**	**13**	**11**	**9**
2Z WL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
4Z WL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
5Z WL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6Z WL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14Z WL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
17Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
18Z WL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
22Z WL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
23Z WL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

Tabela 4.88 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym

	Masy cząsteczkowe [kDa]															
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**
Lp.	**246**	**176**	**135**	**106**	**71**	**58**	**49**	**43**	**38**	**31**	**27**	**25**	**21**	**16**	**11**	**9**
26Z JZ	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
27Z JZ	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
28Z JZ	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
30Z JZ	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
31Z JZ	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
32Z JZ	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
33Z JZ	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
34Z JZ	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
35Z JZ	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

Tabela 4.89 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów

Białko	Ekstrakty plemnikowe z nasienia białego	Ekstrakty plemnikowe z nasienia żółtego
15	0,37	0,49
16	0,38	0,45
17	0,34	0,41
18	0,34	0,42
19	0,35	0,45
23	0,33	0,27

Tabela 4.90 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia pobranego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia

Białko	Sezon wiosenno-letni	Sezon jesienno-zimowy
15	0,50	0,32
16	0,45	0,23
17	0,44	0,27
18	0,43	0,31
19	0,52	0,28
20	0,38	0,25
21	0,33	0,16
22	0,29	0,24
23	0,32	0,28
24	0,36	0,25

Tabela 4.91 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z ekstraktów plemnikowych uzyskanych metodami SDS-PAGE oraz Nano LC-MS/MS

Nr	Zidentyfikowane białko	Gen kodujący	Gatunek	Masa cząsteczkowa wg Multi-Analyst	Masa cząsteczkowa (Da)	Liczba zgodnych peptydów	Pokrycie sekwencji [%]	Score
15	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*	52 kDa	50285	116	44	3511
	Łańcuch beta-1 tubuliny	TBB1	*Gallus gallus*		50377	82	33	2149
	Łańcuch beta-2 tubuliny	TBB2	*Gallus gallus*		50377	82	20	2149
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	81	19	2117
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	78	22	2046
	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	31	17	1258
	Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)	TBA4	*Gallus gallus*		36483	22	26	969
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	23	19	760
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	17	25	735
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	10	9	637
	Kinaza kreatynowa typu S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	9	8	569
	Łańcuch alfa-2 tubuliny	TBA2	*Gallus gallus*		50450	16	16	552
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	6	8	327
	Białko z rodziny polipeptydów posiadających domenę EF	EFHC2	*Gallus gallus*		87461	3	3	146
	Białko 2 zewnętrznego włókna osiowego plemnika	ODF2	*Gallus gallus*		96467	3	3	132
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	2	4	107
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	2	4	107
	Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	*Gallus gallus*		56650	2	2	87
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*		84406 83717	2	1	77
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	2	2	69
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	2	2	63
16	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*	51 kDa	50285	275	64	9253
	Łańcuch beta-2 tubuliny	TBB2	*Gallus gallus*		50377	1	53	52
	Łańcuch beta-7 tubuliny	TBB7	*Gallus gallus*		50095	204	55	5863
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	146	55	4734
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	151	30	4344
	Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)	TBA4	*Gallus gallus*		36483	34	26	1516
	Łańcuch alfa-5 tubuliny	TBA5	*Gallus gallus*		50715	43	27	1299

	Łańcuch alfa-2 tubuliny	TBA2	*Gallus gallus*	51 kDa	50450	23	12	879
	Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	*Gallus gallus*		56650	8	14	321
	Kinaza fosfoglicerynianowa	PGK	*Gallus gallus*		45087	1	3	68
	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	5	4	186
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	2	9	127
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	2	2	62
	Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	*Gallus gallus*		45186	1		44
17	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*	49 kDa	50285	156	57	5103
	Łańcuch beta-2 tubuliny	TBB2	*Gallus gallus*		50377	124	39	3524
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	93	52	2781
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	87	5	2738
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	21		1150
	Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)	TBA4	*Gallus gallus*		36483	18	26	871
	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	24	18	861
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	11	15	651
	Łańcuch alfa-2 tubuliny	TBA2	*Gallus gallus*		50450	14	19	532
	Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	8	17	496
	Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	*Gallus gallus*		56650	14	24	401
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	4	18	260
	Białko szoku termicznego 70 kDa	HSP70	*Gallus gallus*		69936	9	12	247
	Białko z rodziny polipeptydów posiadających domenę EF	EFHC2	*Gallus gallus*		87461	5	3	240
	Białko 2 zewnętrznego włókna osiowego plemnika	ODF2	*Gallus gallus*		96467	3	6	181
	Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	*Gallus gallus*		74025	1	2	46
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	2	2	70
	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*		73285	9	2	240
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	2	3	107
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	1	4	71
	Białko chaperonowe 70 (forma mitochondrialna)	HSPA9	*Gallus gallus*		73432	1	1	51
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	1	2	48
	Cytochrom C	CYC	*Gallus gallus*		11817	1	12	45

			Meleagris gallopavo	49 kDa	11817	1	12	45
18	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*	43 kDa	50285	86	49	2577
	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	59	53	2460
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	42	33	2208
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	58	22	1724
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	50	24	1650
	Łańcuch alfa-1 tubuliny	TBA1	*Gallus gallus*		46385	33	38	1175
	Kinaza kreatynowa typu S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	13	26	691
	Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)	TBA4	*Gallus gallus*		36483	10	22	563
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	7	15	486
	Białko szoku termicznego 70 kDa	HSP70	*Gallus gallus*		69936	9	11	230
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	4	15	209
	Aktyna (forma cytoplazmatyczna 2)	ACTG1	*Gallus gallus*		42108	3	9	159
	Aminotransferaza aspraginianowa (forma mitochondrialna)	GOT2	*Gallus gallus*		47496	3	6	147
	Białko z rodziny polipeptydów posiadających domenę EF	EFHC2	*Gallus gallus*		87461	2	3	93
	Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	*Gallus gallus*		74025	2	2	91
	Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	*Gallus gallus*		56650	2	5	86
	Kinaza fosfoglicerynianowa	PGK	*Gallus gallus*		45087	1	3	68
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	2	2	66
	Białko chaperonowe 70 (forma mitochondrialna)	HSPA9	*Gallus gallus*		73432	1	1	51
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	1	4	46
19	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*	40 kDa	43129	55	23	2758
	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	42	51	1592
	Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	39	30	1333
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	36	33	1005
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	25	19	693
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	24	32	631
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	9	9	442
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	5	15	328
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	4	20	204
	Aminotransferaza aspraginianowa (forma mitochondrialna)	GOT2	*Gallus gallus*		47496	7	13	177
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB	*Gallus gallus*		42366 42367 42052	2	4	110

		ACTC ACTG ACTG2 ACT5		40 kDa	42334 42108 42249 42151			
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	1	5	86
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	1	4	82
	Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	*Gallus gallus*		74025	1	1	46
20	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	29 kDa	71868	58	47	2535
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	32	22	1388
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	27	37	780
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	20	26	719
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	14	14	422
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	8	31	410
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	14	41	365
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	4	15	295
	Łańcuch alfa-5 tubuliny	TBA5	*Gallus gallus*		50715	6	12	273
	Białko chaperonowe 70 (forma mitochondrialna)	HSPA9	*Gallus gallus*		73432	9	10	272
	Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną	RPS27A	*Gallus gallus*		18310	4	39	214
	Poliubikwityna B	UBB	*Gallus gallus*		34348	4	13	214
	Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	3	5	180
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	3	5	156
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*		84406 83717	5 5	6 6	143 143
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	2	14	123
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	3	7	106
	Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	*Gallus gallus*		56650	3	8	105
	Podjednostka flawoproteinowa A dehydrogenazy bursztynianowej	SDHA	*Gallus gallus*		74025	1	2	99
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	2	4	91
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	2	4	91
	Syntaza kwasów tłuszczowych	FASN	*Gallus gallus*		277630	2	1	75
	Radyksyna	RDX	*Gallus gallus*		68626	2	1	72
	Białko 50A kontrolujące cykl komórkowy	TMEM30A	*Gallus gallus*		41821	2	2	72
	Czynnik elongacyjny II	EEF2	*Gallus gallus*		96343	1	2	69
	Gamma- glutamylotransferaza 2 białko-glutamina	TGM2	*Gallus gallus*		79118	1	2	68
	ATPaza 13a4 transportująca kationy	ATP13A4	*Gallus gallus*		135682	2	1	68

	Mitochondrialny antyport H^+/Ca^{2+}	LETM1	*Gallus gallus*	29 kDa	86422	1	1	54
	Gelsolina	GSN	*Gallus gallus*		86120	1	1	46
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	1	3	46
21	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	24 kDa	71868	72	42	2853
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	21	42	1052
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	18	28	1038
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	33	45	848
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	12	20	722
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	22	43	523
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	19	19	503
	Kinaza kreatynowa typu S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	7	14	412
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	8	11	330
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	10	15	301
	Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)	TBA4	*Gallus gallus*		36483	6	21	301
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	4	9	217
	Kinaza fosfoglicerynianowa	PGK	*Gallus gallus*		45087	5	15	180
	Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	*Gallus gallus*		56650	6	13	171
	Mutaza fosfoglicerynianowa 1	PGAM1	*Gallus gallus*		29051	3	21	154
	Podjednostka żelazowo-siarkowa dehydrogenazy bursztynianowej (forma mitochondrialna)	SDHB	*Gallus gallus*		33374	4	9	146
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	3	3	132
	Łańcuch alfa-2 tubuliny	TBA2	*Gallus gallus*		50450	4	9	127
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	3	9	114
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	3	11	111
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	3	11	111
	Białko z rodziny polipeptydów posiadających domenę EF	EFHC2	*Gallus gallus*		87461	2	1	105
	Białko 18 towarzyszące spermatogenezie	SPATA18	*Gallus gallus*		54997	1	3	99
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	2	6	92
	Białko 2 zewnętrznego włókna osiowego plemnika	ODF2	*Gallus gallus*		96467	1	2	92
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AB1	*Gallus gallus*		83717	2	3	85

	Anhydraza węglanowa-2	CA2	*Gallus gallus*		29388	1	2	83
	Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	*Gallus gallus*		74025	1	2	83
	Białko RAB10 z podrodziny Ras	RAB10	*Gallus gallus*		22763	2	5	82
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	1	4	82
	Podjednostka Rieske kompleksu cytochromu b-c1 (forma mitochondrialna)	UQCRFS1	*Gallus gallus*		29710	1	7	81
	Dehydrogenaza mleczanowa (łańcuch B)	LDHB	*Gallus gallus*		36694	1	3	74
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	2	2	69
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	1	3	68
	ATPaza 13A4 transportująca kationy	ATP13A4	*Gallus gallus*		135682	2	1	68 67
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*	24 kDa	46134	1	5	67
	Czynnik elongacyjny II	EEF2	*Gallus gallus*		96343	1	2	72 67
	Podjednostka eta białka 1 T-kompleksu	CCT7	*Gallus gallus*		60881	1	4	66
	ATP-zależna helikaza RNA DDX1	DDX1	*Gallus gallus*		83458	1	2	65
	Izomeraza triozofosforanowa	TPI1	*Gallus gallus*		26832	2	6	80
	Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną	RPS27A	*Gallus gallus*		18310	1	23	93
	Poliubikwityna B	UBB	*Gallus gallus*		34348	1	7	93
	S-transferaza glutationowa	GST	*Gallus gallus*		25282	2	10	60
	Peroksyredoksyna-1	PRDX1	*Gallus gallus*		22529	2	5	65
	Podjednostka zeta białka 1 T-kompleksu	CCT6	*Gallus gallus*		58008	1	2	50
	Aldolaza C fruktozo-bisfosforanowa	ALDOC	*Gallus gallus*		14543	1	4	49
	Białko RhoC wiążące GTP	RHOC	*Gallus gallus*		22301	1	8	44
22	Albumina	ALB	*Gallus gallus*		71868	95	76	4252
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	37	50	1241
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	17	26	986
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	25	22	833
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	15	34	818
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*	18 kDa	30162	16	46	807
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	27	28	791
	Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	9	19	580
	Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)	TBA4	*Gallus gallus*		36483	11	22	553
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	6	11	225
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	4	5	171
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	5	11	171

	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*	18 kDa	71011	4	11	150
	Aminotransferaza aspraginianowa (forma mitochondrialna)	GOT2	*Gallus gallus*		47496	3	5	149
	Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną	RPS27A	*Gallus gallus*		18310	3	44	143
	Poliubikwityna B	UBB	*Gallus gallus*		34348	3	14	143
	Białko 4 wiążące retinol	RBP4	*Gallus gallus*		22843	3	21	134
	Podjednostka Rieske kompleksu cytochromu b-c1 (forma mitochondrialna)	UQCRFS1	*Gallus gallus*		29710	2	13	125
	Białko RAP1B z rodziny Ras	RAP1B	*Gallus gallus*		21040	4	13	123
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	3	6	122
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	2	4	122
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	3	9	111
	Białko 20 towarzyszące witce	CFAP20	*Gallus gallus*		22905	3	15	106
	Białko szoku termicznego 90 kDa	HSP90AA1 HSP90AB1	*Gallus gallus*		84406 83717	2 2	1 1	103 103
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	2	8	102
	Homolog białka 42 kontrolujący podziały komórkowe	CDC42	*Gallus gallus*		21601	2	10	82
	Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	*Gallus gallus*		73285	1	2	80
	Podjednostka katalityczna beta fosfatazy PP1 serynowo-treoninowej białek	PPP1CB	*Gallus gallus*		37961	1	3	78
	GTPaza HRAS GTPaza NRAS	HRAS NRAS	*Gallus gallus*		21694 21550	1	6	74
	Deglikaza DJ-1 białek/kwasów nukleinowych	PARK7	*Gallus gallus*		20159	1	7	69
	Kinaza fosfoglicerynianowa	PGK	*Gallus gallus*		45087	1	4	61
	Podjednostka alfa-2 acetylohydrolazy IB czynnika aktywującego płytki (PAF)	PAFAH1B2	*Gallus gallus*		25665	2	3	60
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Gallus gallus*		35909	1	7	58
	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	*Meleagris gallopavo*		25065	1	7	58
	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	*Gallus gallus*		46134	1	3	58
	Peroksyredoksyna-1	PRDX1	*Gallus gallus*		22529	1	5	57

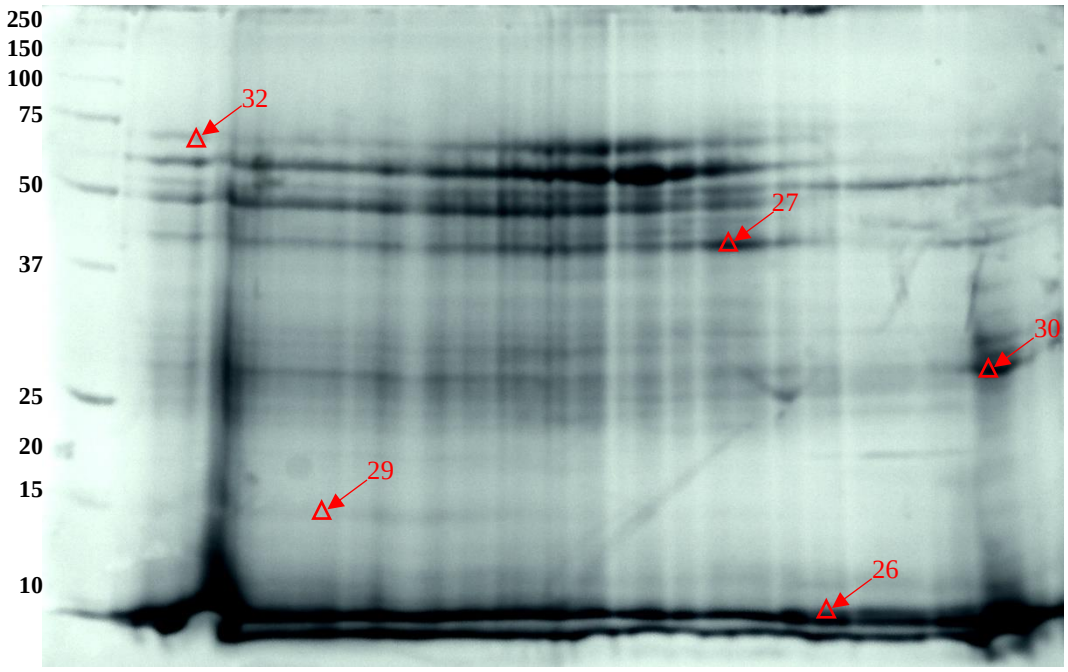
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*	18 kDa	30661	1	4	56
	Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	*Gallus gallus*		74025	1	4	53
	Łańcuch ciężki ferrytyny	FTH	*Gallus gallus*		21249	1	6	47
23	Albumina	ALB	*Gallus gallus*	15 kDa	71868	70	62	3019
	Łańcuch beta-3 tubuliny	TBB3	*Gallus gallus*		50285	55	49	1701
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	21	35	1121
	Łańcuch beta-5 tubuliny	TBB5	*Gallus gallus*		50395	29	19	992
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	16	26	982
	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Gallus gallus*		50844	29	20	889
	Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	11	23	758
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	14	52	755
	Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)	TBA4	*Gallus gallus*		36483	9	22	465
	Podjednostka Rieske kompleksu cytochromu b-c1 (forma mitochondrialna)	UQCRFS1	*Gallus gallus*		29710	6	13	359
	Białko 20 towarzyszące witce	CFAP20	*Gallus gallus*		22905	9	44	307
	Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną	RPS27A	*Gallus gallus*		18310	5	63	255
	Poliubikwityna B	UBB	*Gallus gallus*		34348	5	20	255
	Białko RAP1B z rodziny Ras	RAP1B	*Gallus gallus*		21040	7	13	226
	Łańcuch ciężki ferrytyny	FTH	*Gallus gallus*		21249	7	19	209
	Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	*Gallus gallus*		74025	5	13	194
	Białko 4 wiążące retinol	RBP4	*Gallus gallus*		22843	3	16	176
	Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	*Gallus gallus*		11525	5	11	153
	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	*Gallus gallus*		46929	3	5	142
	Transtyretyna	TTR	*Gallus gallus*		16356	2	8	126
	Lizozym G	LYG	*Gallus gallus*		23565	3	8	125
	Owotransferyna	TRFE	*Gallus gallus*		79551	2	1	102
	Białko wiążące osłonę przejrzystą 1	ZPBP1	*Gallus gallus*		36910	4	6	98
	Podjednostka teta białka 1 T-kompleksu	CCT8	*Gallus gallus*		60017	2	6	95
	Apolipoproteina A 1	APOA1	*Gallus gallus*		30661	3	9	93
	Białko wiążące kwasy tłuszczowe	FABP7	*Gallus gallus*		15031	1	16	86
	Homolog białka 42 odpowiadającego za podziały komórkowe	CDC42	*Gallus gallus*		21601	2	10	84
	Kalmodulina	CALM CCM1	*Gallus gallus*		16827 16990	1	11	82
	Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	*Gallus gallus*		43529	1	4	82

	Podjednostka katalityczna beta fosfatazy PP1 serynowo-treoninowej białek	PPP1CB	*Gallus gallus*		37961	1	3	79
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	2	4	78
	GTPaza HRAS GTPaza NRAS	HRAS NRAS	*Gallus gallus*		21694 21550	1	6	61
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	1	9	54
	Białko z rodziny 2 rozpuszczalnych transporterów, ułatwiające transport glukozy	SLC2A3	*Gallus gallus*		54539	1	2	54
	Aminotransferaza aspraginianowa (forma mitochondrialna)	GOT2	*Gallus gallus*		47496	1	2	51
	Podjednostka alfa-2 acetylohydrolazy IB czynnika aktywującego płytki (PAF)	PAFAH1B2	*Gallus gallus*		25665	1	3	47
24	Łańcuch beta tubuliny	TBB3 TBB2 TBB7 TBB4 TBB5	*Gallus gallus*		50285 50377 50095 50844 50395	303 285 212 134 119	69 54 57 30 24	9548 9083 6075 4023 3740
	Łańcuch alfa tubuliny	TBA5 TBA4	*Gallus gallus*		50715 36483	45 30	36 30	1526 1351
	Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	*Gallus gallus*	13 kDa	56650	38	47	1306
	Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	*Gallus gallus*		43129	22	31	1172
	Alfa enolaza	ENO1	*Gallus gallus*		47617	19	30	1039
	Łańcuch alfa-2 tubuliny	TBA2	*Gallus gallus*		50450	23	17	873
	Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	*Gallus gallus*		71011	22	27	793
	Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)	CKMT2	*Gallus gallus*		47510	12	23	668
	Białko szoku termicznego 70 kDa	HSP70	*Gallus gallus*		69936	13	14	364
	Akrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*		38724	6	15	359
	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*		30162	5	15	230
	Białko 2 zewnętrznego włókna osiowego plemnika	ODF2	*Gallus gallus*		96467	4	2	177

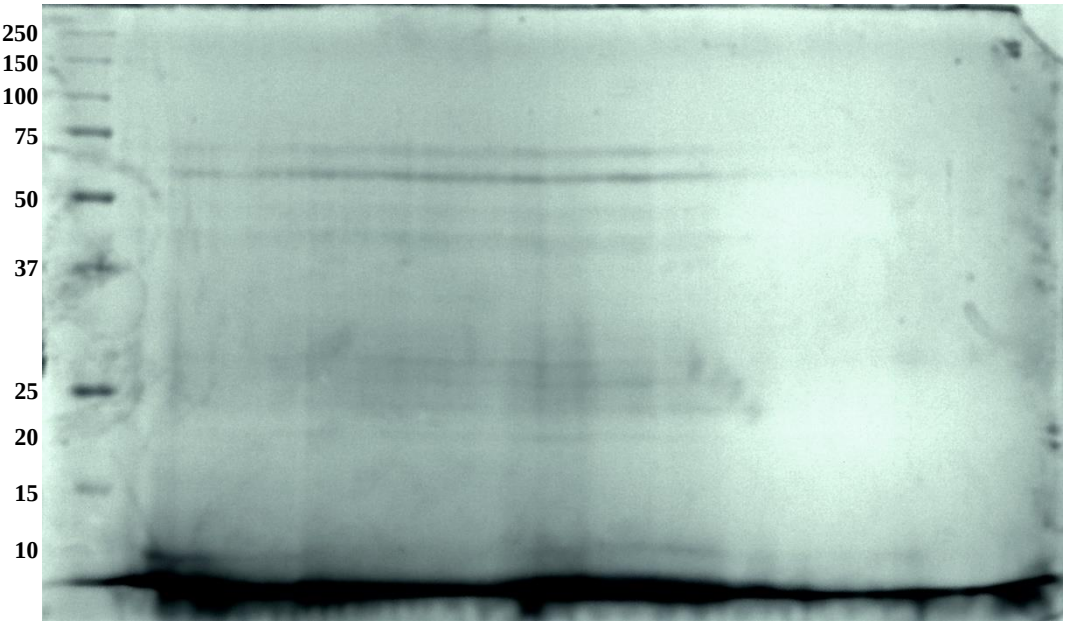
	Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	*Gallus gallus*		74025	2	2	160
	Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG2 ACT5	*Gallus gallus*		42366 42367 42052 42334 42108 42249 42151	3	4	147
	Białko z rodziny polipeptydów posiadających domenę EF	EFHC2	*Gallus gallus*	13 kDa	87461	2	3	124
	Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną	RPS27A	*Gallus gallus*		18310	2	47	109
	Poliubikwityna B	UBB	*Gallus gallus*		34348	2	15	109
	Kinaza pirogronianowa	PKM	*Gallus gallus*		58434	3	9	105
	Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	*Gallus gallus*		50467	3	7	102
	Czynnik NHE-RF1 regulujący wymianę jonów Na^+/H^+	NHERF1	*Gallus gallus*		36011	1	6	92
	Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	*Gallus gallus*		36748	2	5	76
	Białko chaperonowe 70 (forma mitochondrialna)	HSPA9	*Gallus gallus*		73432	1	1	57
	Kinaza fosfoglicerynianowa	PGK	*Gallus gallus*		45087	1	3	54
	Izomeraza triozofosforanowa	TPI1	*Gallus gallus*		26832	1		48
	Radyksyna	RDX	*Gallus gallus*		68626	1	1	47

Dzięki zastosowaniu analizy elektroforegramów 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia indorów wybrano 5 frakcji białkowych, które poddano identyfikacji przy pomocy metody MALDI-TOF/TOF **(Rycina 4.33, Rycina 4.34, Rycina 4.35, Rycina 4.36)**. Wybór białek był podyktowany średnimi wartościami gęstości optycznych danych frakcji białkowych **(Tabela 4.92, Tabela 4.93)**. Rozdziały elektroforetyczne 2D-PAGE białek plemnikowych były jeszcze trudniejsze i sprawiały więcej komplikacji niż rozdziały białek plazmowych. Plemniki, w wyniku poddawania nasienia obróbce technologicznej i działania na nie detergentami, zbijały się w trudno rozpuszczalne osady. Mimo wielu prób, białka rozdzielały się tworząc poziome pasy widoczne w szczególności na elektroforegramach świeżych ekstraktów plemnikowych Kolejne podejmowane próby zmiany ilości nanoszonego białka czy warunków rozdziału nie przynosiły zadowalających rezultatów **(Rycina 4.29, Rycina 4.30, Rycina 4.31, Rycina 4.32)**.

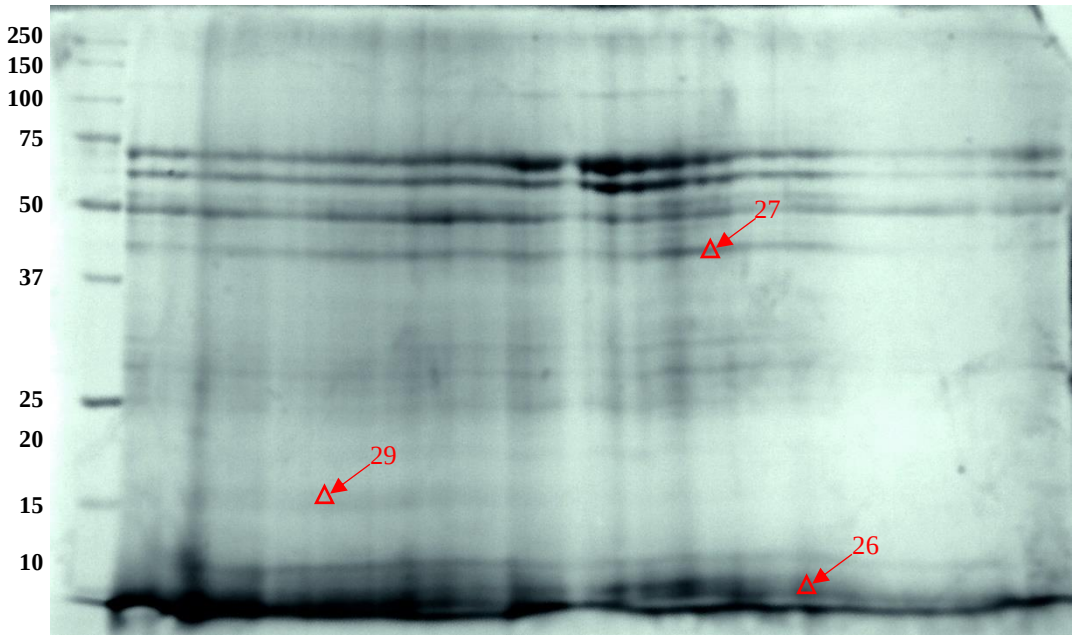
Wyniki identyfikacji wyizolowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia indora za pomocą spektrometrii mas metodą MALDI-TOF/TOF zostały umieszczone w **Tabeli 4.94**.



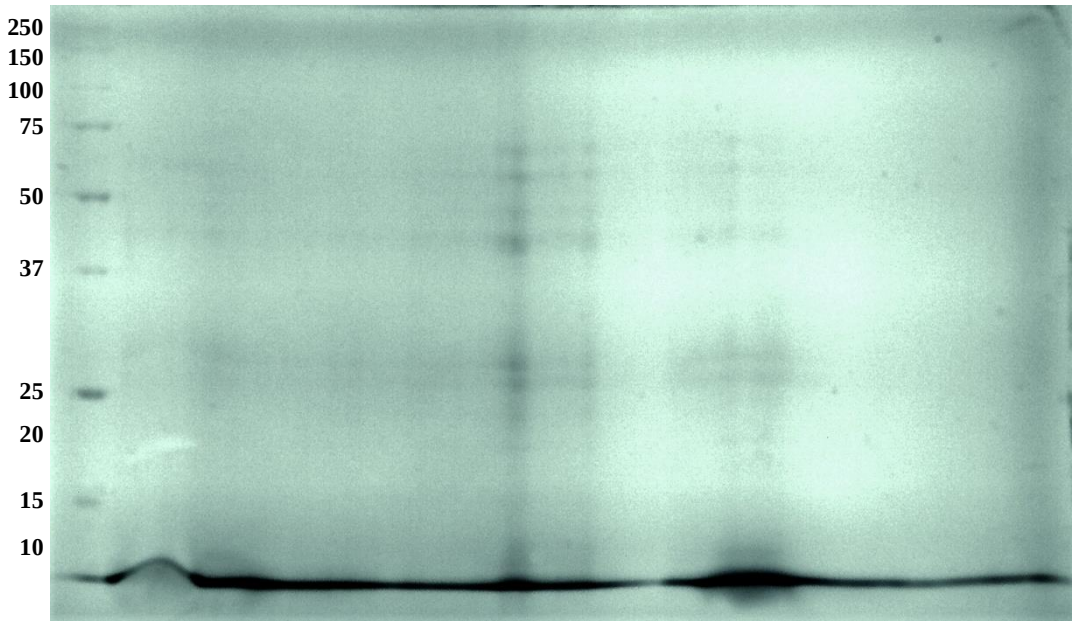
Rycina 4.29 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim
26 – 7,4 kDa, pI 8,15; 27 – 40,9 kDa, pI 7,44; 29 – 15,4 kDa, pI 4,24; 30 – 27,5 kDa, pI 9,46; 32 – 71,4 kDa, pI 3,11



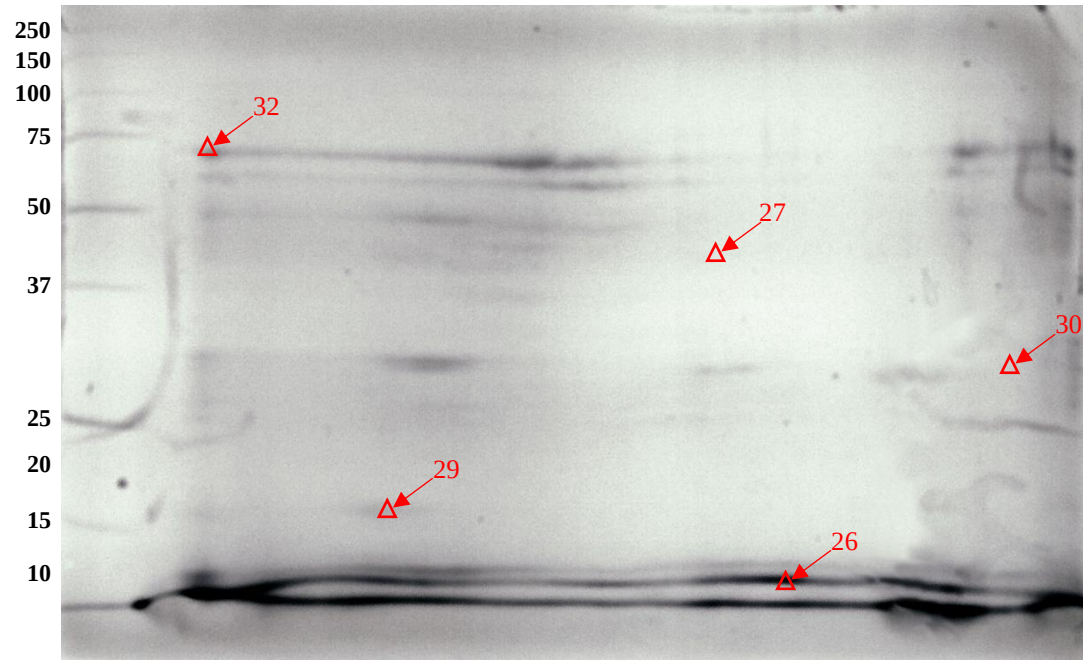
Rycina 4.30 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym



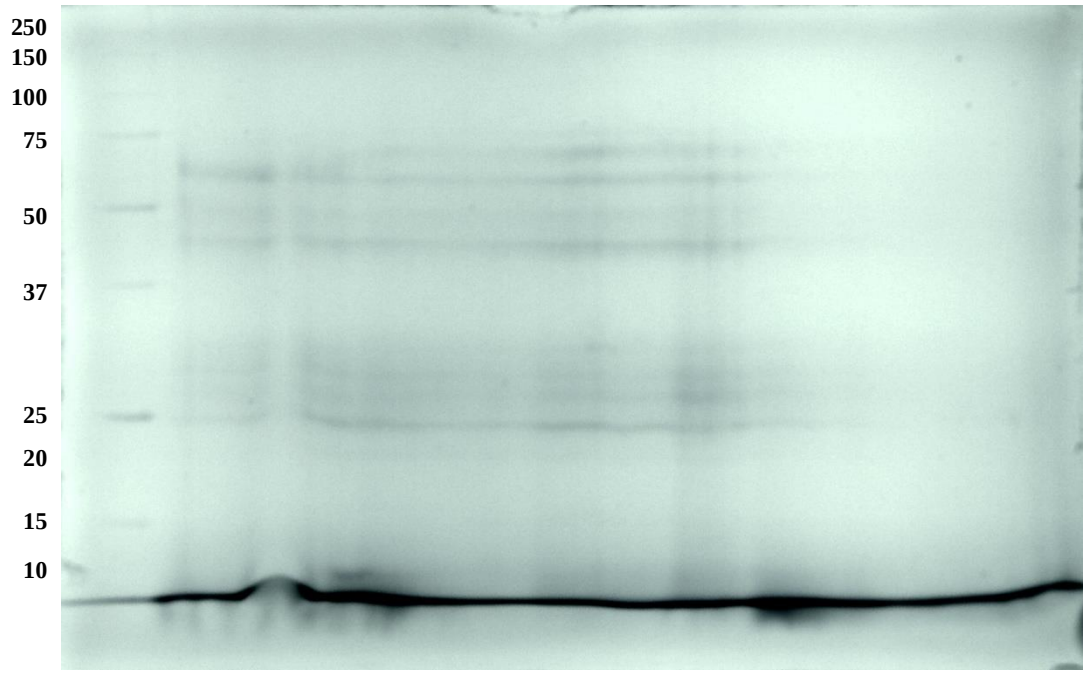
Rycina 4.31 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim
26 - 7,4 kDa, pI 8,15; 27 – 40,9 kDa, pI 7,44; 29 – 15,4 kDa, pI 4,24



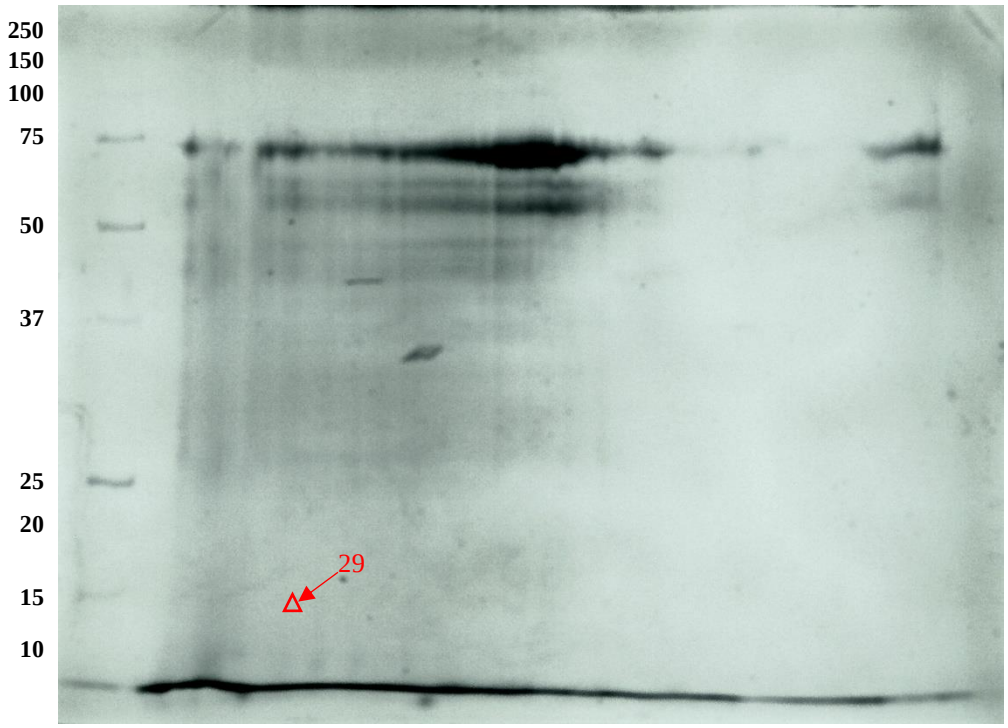
Rycina 4.32 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym



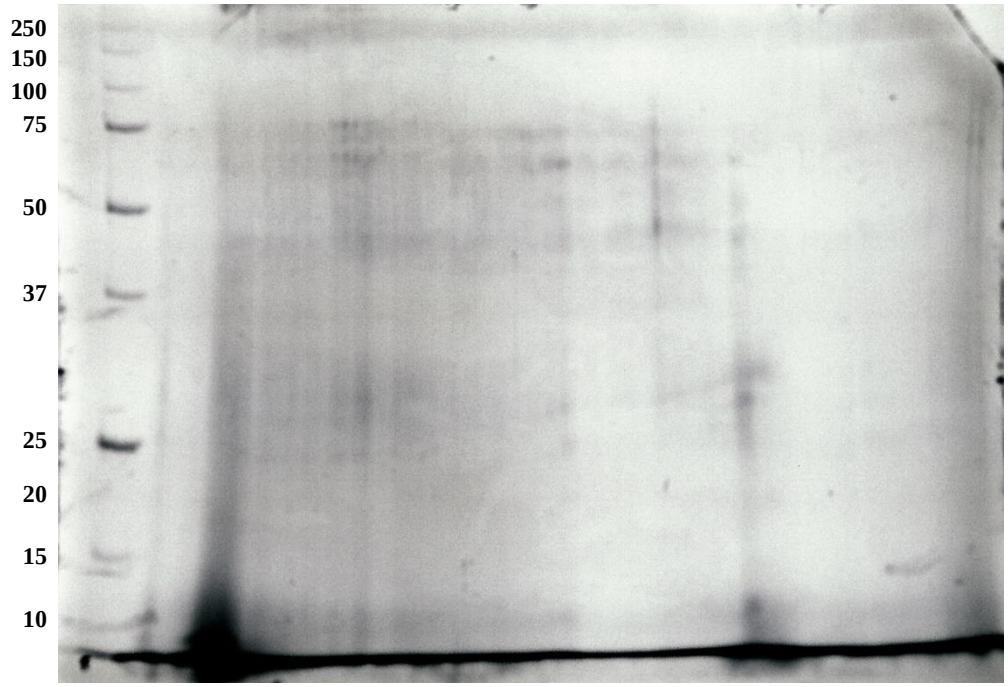
Rycina 4.33 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim
26 – 7,4 kDa, pI 8,15; 27 – 40,9 kDa, pI 7,44; 29 – 15,4 kDa, pI 4,24; 30 – 27,5 kDa, pI 9,46; 32 – 71,4 kDa, pI 3,11



Rycina 4.34 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym



Rycina 4.35 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim
29 – 15,4 kDa, pI 4,24



Rycina 4.36 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym

Tabela 4.92 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów

Białko	Ekstrakty plemnikowe białe	Ekstrakty plemnikowe żółte
26	0,35	0,46
27	0,07	0,24
29	0,18	0,14
30	0,26	0,20
32	0,15	0,28

Tabela 4.93 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia pobranego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia

Białko	Sezon wiosenno-letni	Sezon jesienno-zimowy
26	0,47	0,34
27	0,23	0,07
30	0,26	0,21
32	0,32	0,10

Tabela 4.94 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z ekstraktów plemnikowych uzyskanych metodami 2D-PAGE oraz MALDI-TOF/TOF

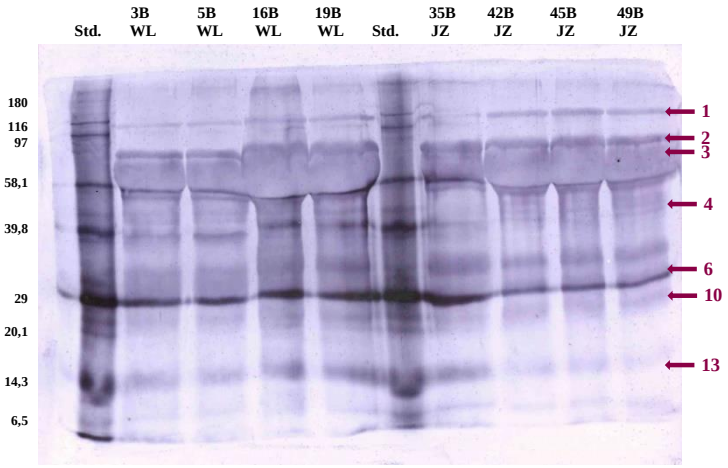
Nr	Zidentyfikowane białko	Gen kodujący	Gatunek	Masa wg PDQuest	Masa wg MASCOT [Da]	Liczba unikalnych peptydów	Score
26	Proakrozyna	ACR	*Meleagris gallopavo*	7 400	38 724	2	101
27	Kinaza keratynowa podtyp B	CKB	*Meleagris gallopavo*	40 900	42 982	3	265
29	Łańcuch beta-4 tubuliny	TBB4	*Meleagris gallopavo*	15 400	42 277	3	149
30	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	*Meleagris gallopavo*	27 500	30 162	1	158
32	Albumina	ALB	*Meleagris gallopavo*	71 400	71 740	2	100

* score istotny statystycznie wynosi >60

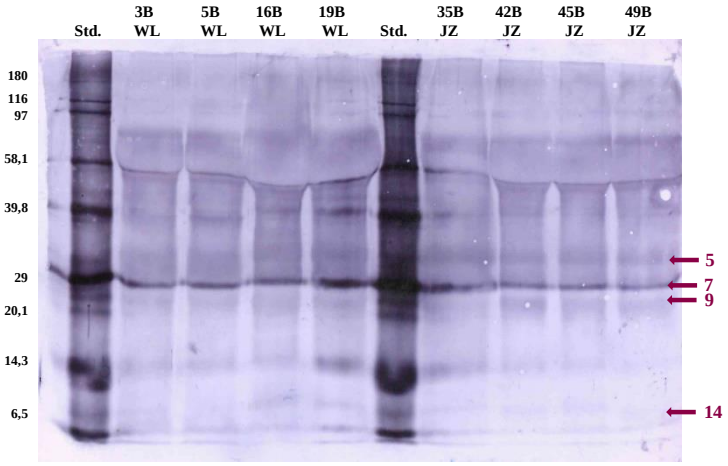
4.8. Immunodetekcja fosfoprotein białych i żółtych plazm nasienia indorów podczas sezonów wiosenno-letniego i jesienno-zimowego

Przy pomocy metod Western- i Immunoblotting potwierdzono, że zarówno rodzaj nasienia, jak i trwający sezon, znacząco wpływają na profil ekspresji fosfoprotein plazm nasienia oraz plemników indora. Profile fosforylacji białek plazm nasienia pochodzących z ejakulatów białych **(Rycina 4.37, Rycina 4.38, Rycina 4.39)** i żółtych **(Rycina 4.40, Rycina 4.41, Rycina 4.42)** były częściowo zbieżne, zwłaszcza jeśli chodzi o fosfoproteiny niskocząsteczkowe. W żółtym nasieniu wykazano znacznie większą liczbę ufosforylowanych fosfoprotein o masach cząsteczkowych pomiędzy 60 a 20 kDa. Dzięki zastosowaniu metod Western i Immunoblotting w plazmach potwierdzono obecność fosfoprotein o masach 106, 76, 69, 41, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 16, 11 i 7 kDa.

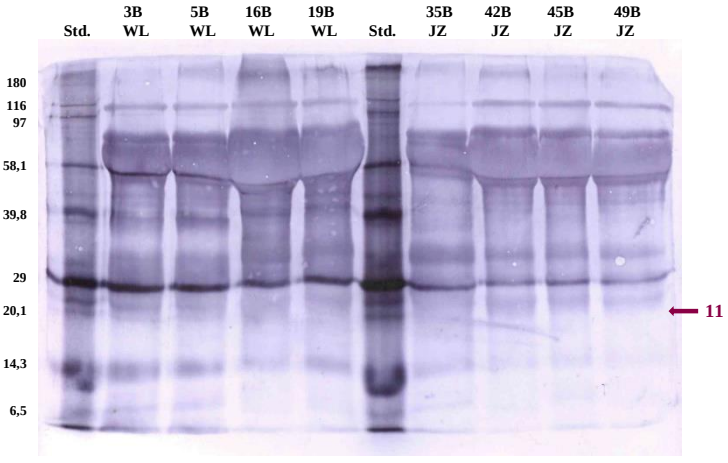
Analiza gęstości optycznej wybarwionych frakcji wykazała, że wybrane białka obecne w plazmie nasienia białego o masach 106, 76, 69, 41, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 16 i 7 kDa podlegały silniejszemu ufosforylowaniu reszt tyrozylowych w porównaniu z białkami z plazm nasienia żółtego. Ponadto, polipeptydy o masach cząsteczkowych 106, 41 31 i 30 kDa ulegały statystycznie istotnie silniejszej fosforylacji reszt treoninowych w plazmie nasienia białego. Jedynym wyjątkiem było białko o masie 20 kDa, które prezentowało silniejszy stopień fosforylacji reszt treonylowych w nasieniu żółtym (**Tabela 4.95**). Sezon wiosenno-letni wpływał na intensywniejszą fosforylację reszt serynowych w białkach 41, 28, 27, 20 i 16 kDa bez względu na rodzaj nasienia. Trzy z uprzednio wymienionych polipeptydów, tj. 28, 27 i 20 kDa, oraz białko o masie 11 kDa ulegały istotnie silniejszej fosforylacji reszt tyrozylowych. Z kolei polipeptyd o masie cząsteczkowej około 26 kDa wykazywał silniejszą fosforylację reszt treonylowych w sezonie wiosenno-letnim w obu rodzajach nasienia (**Tabela 4.96**).



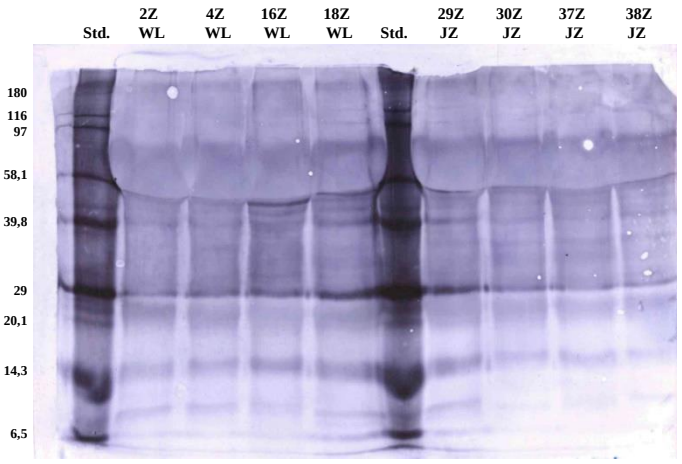
Rycina 4.37 Analiza fosfoproteomów plazm białego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych



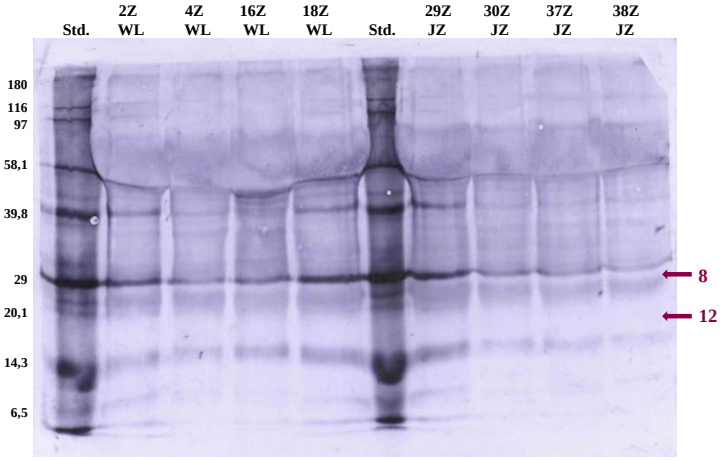
Rycina 4.38 Analiza fosfoproteomów plazm białego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych



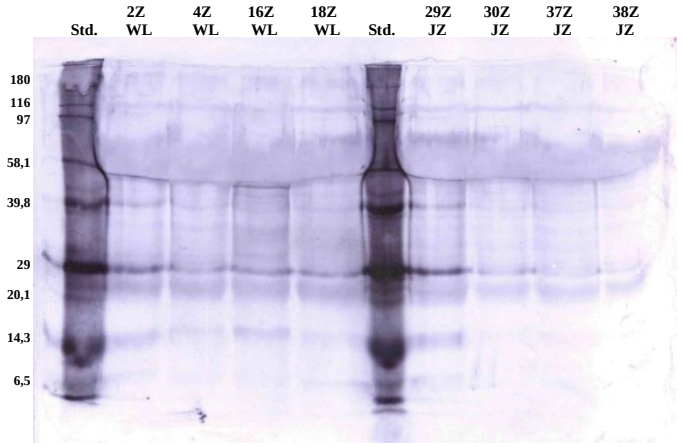
Rycina 4.39 Analiza fosfoproteomów plazm białego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych



Rycina 4.40 Analiza fosfoproteomów plazm żółtego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych



Rycina 4.41 Analiza fosfoproteomów plazm żółtego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych



Rycina 4.42 Analiza fosfoproteomów plazm żółtego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych

Tabela 4.95 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein plazm nasienia pochodzących z białego i żółtego nasienia bez względu na sezon. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM. Kolorem bordowym zaznaczono różnice statystycznie istotne pomiędzy rodzajami nasienia w obrębie jednej ufosforylowane reszty

Białko	Masa cząsteczkowa wg Multi-Analyst	Ufosforylowana reszta	Rodzaj nasienia	Średnia arytmetyczna	± SEM
1	106 kDa	SER	B	0,16	0,01
			Z	0,18	0,01
		THR	**B**	**0,15**	**0,01**
			Z	**0,12**	**0,01**
		TYR	**B**	**0,16**	**0,01**
			Z	**0,06**	**0,01**
2	76 kDa	SER	B	0,24	0,01
			Z	0,27	0,01
		THR	**B**	**0,20**	**0,01**
			Z	**0,16**	**0,01**
		TYR	**B**	**0,27**	**0,01**
			Z	**0,11**	**0,01**
3	69 kDa	**SER**	**B**	**0,21**	**0,01**
			Z	**0,24**	**0,01**
		THR	**B**	**0,21**	**0,01**
			Z	**0,18**	**0,00**
		TYR	**B**	**0,27**	**0,01**
			Z	**0,11**	**0,01**
4	41 kDa	SER	B	0,23	0,03
			Z	0,26	0,02
		THR	B	0,25	0,03
			Z	0,22	0,03
		TYR	**B**	**0,23**	**0,02**
			Z	**0,10**	**0,01**
5	31 kDa	SER	B	0,24	0,02
			Z	0,22	0,02
		THR	B	0,23	0,01
			Z	0,17	0,01
		TYR	**B**	**0,24**	**0,02**
			Z	**0,09**	**0,02**
6	30 kDa	SER	B	0,24	0,02
			Z	0,24	0,02
		THR	B	0,23	0,01
			Z	0,20	0,01
		TYR	**B**	**0,22**	**0,02**
			Z	**0,11**	**0,02**
7	29 kDa	SER	B	0,48	0,05
			Z	0,34	0,04
		THR	B	0,39	0,04
			Z	0,35	0,06
		TYR	**B**	**0,45**	**0,06**
			Z	**0,17**	**0,04**
8	28 kDa	SER	B	0,24	0,06
			Z	0,20	0,04
		THR	B	0,20	0,03
			Z	0,21	0,05
		TYR	**B**	**0,24**	**0,04**
			Z	**0,11**	**0,03**
9	27 kDa	SER	B	0,16	0,02

			Z	0,17	0,01
		THR	B	0,14	0,01
			Z	0,16	0,01
		TYR	**B**	**0,15**	**0,01**
			Z	**0,09**	**0,02**
10	26 kDa	SER	B	0,17	0,02
			Z	0,18	0,01
		THR	B	0,14	0,01
			Z	0,16	0,01
		TYR	**B**	**0,15**	**0,01**
			Z	**0,10**	**0,02**
11	20 kDa	SER	B	0,08	0,01
			Z	0,12	0,02
		THR	B	0,12	0,01
			Z	0,11	0,01
		TYR	B	0,12	0,02
			Z	0,06	0,01
12	16 kDa	SER	B	0,09	0,01
			Z	0,10	0,01
		THR	B	0,10	0,01
			Z	0,12	0,02
		TYR	B	0,06	0,00
			Z	0,05	0,01
13	11 kDa	SER	B	0,06	0,01
			Z	0,06	0,01
		THR	B	0,07	0,00
			Z	0,07	0,01
		TYR	**B**	**0,05**	**0,01**
			Z	**0,03**	**0,00**
14	7 kDa	SER	B	0,06	0,00
			Z	0,05	0,01
		THR	B	0,09	0,01
			Z	0,07	0,01
		TYR	**B**	**0,05**	**0,01**
			Z	**0,02**	**0,00**

Tabela 4.96 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein plazm nasienia pochodzących z sezonu wiosenno-letniego i jesienno-zimowego bez względu na występowanie syndromu żółtego nasienia. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM. Kolorem bordowym zaznaczono różnice statystycznie istotne pomiędzy sezonami, z których pochodziły ejakulaty w obrębie jednej ufosforylowane reszty

Białko	Masa cząsteczkowa wg Multi-Analyst	Ufosforylowana reszta	Sezon	Średnia arytmetyczna	± SEM
1	106 kDa	SER	WL	0,17	0,01
			JZ	0,16	0,01
		THR	WL	0,14	0,01
			JZ	0,13	0,01
		TYR	WL	0,12	0,02
			JZ	0,09	0,02
2	76 kDa	SER	WL	0,25	0,01
			JZ	0,25	0,01
		THR	WL	0,18	0,02
			JZ	0,18	0,01
		TYR	WL	0,21	0,04
			JZ	0,17	0,03
3	69 kDa	SER	WL	0,24	0,01
			JZ	0,22	0,01
		THR	WL	0,20	0,01
			JZ	0,19	0,01
		TYR	WL	0,21	0,03
			JZ	0,17	0,03
4	41 kDa	SER	WL	0,28	0,03
			JZ	0,20	0,02
		THR	WL	0,26	0,03
			JZ	0,21	0,03
		TYR	WL	0,20	0,03
			JZ	0,14	0,03
5	31 kDa	**SER**	**WL**	**0,26**	**0,02**
			JZ	**0,21**	**0,02**
		THR	WL	0,22	0,01
			JZ	0,19	0,02
		TYR	WL	0,20	0,03
			JZ	0,13	0,03
6	30 kDa	**SER**	**WL**	**0,27**	**0,01**
			JZ	**0,20**	**0,01**
		THR	**WL**	**0,24**	**0,01**
			JZ	**0,19**	**0,01**
		TYR	WL	0,21	0,02
			JZ	0,13	0,02
7	29 kDa	SER	WL	0,47	0,04
			JZ	0,34	0,05
		THR	WL	0,43	0,05
			JZ	0,31	0,05
		TYR	WL	0,39	0,07
			JZ	0,23	0,06
8	28 kDa	SER	WL	0,22	0,03
			JZ	0,22	0,07
		THR	WL	0,20	0,02
			JZ	0,22	0,06
		TYR	WL	0,23	0,05
			JZ	0,12	0,02

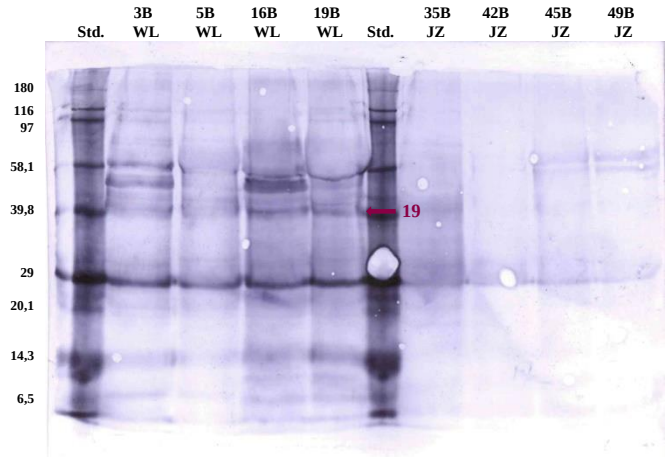
9	27 kDa	SER	WL	0,17	0,01
			JZ	0,16	0,02
		THR	WL	0,15	0,00
			JZ	0,15	0,01
		TYR	**WL**	**0,15**	**0,01**
			JZ	**0,09**	**0,02**
10	26 kDa	**SER**	**WL**	**0,21**	**0,01**
			JZ	**0,14**	**0,01**
		THR	WL	0,16	0,01
			JZ	0,15	0,01
		TYR	**WL**	**0,15**	**0,01**
			JZ	**0,09**	**0,02**
11	20 kDa	**SER**	**WL**	**0,13**	**0,01**
			JZ	**0,07**	**0,01**
		THR	WL	0,13	0,01
			JZ	0,10	0,01
		TYR	**WL**	**0,11**	**0,02**
			JZ	**0,06**	**0,01**
12	16 kDa	SER	WL	0,11	0,01
			JZ	0,08	0,01
		THR	**WL**	**0,12**	**0,01**
			JZ	**0,09**	**0,02**
		TYR	WL	0,07	0,00
			JZ	0,04	0,01
13	11 kDa	**SER**	**WL**	**0,07**	**0,00**
			JZ	**0,04**	**0,01**
		THR	WL	0,07	0,00
			JZ	0,06	0,01
		TYR	WL	0,05	0,01
			JZ	0,03	0,01
14	7 kDa	SER	WL	0,07	0,01
			JZ	0,04	0,01
		THR	WL	0,09	0,01
			JZ	0,07	0,01
		TYR	WL	0,04	0,01
			JZ	0,03	0,00

4.9. Immunodetekcja fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych i żółtych ejakulatów indorów podczas sezonów wiosenno-letniego i jesienno-zimowego

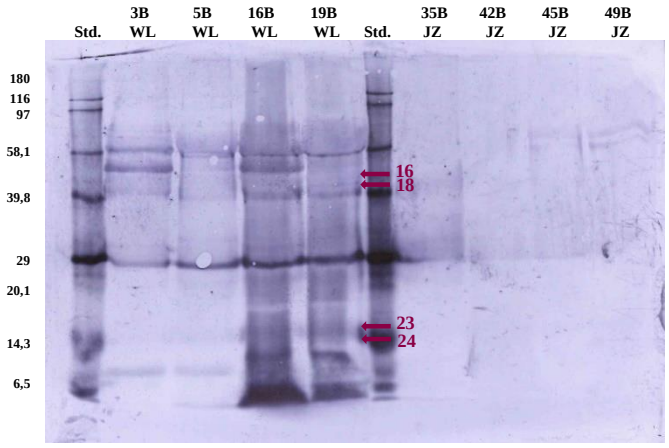
Immunodetekcji poddano również ekstrakty plemnikowe. Zaobserwowano nasiloną fosforylację białek pochodzących z plemników nasienia żółtego **(Rycina 4.46, Rycina 4.47, Rycina 4.48)**. Silniejszemu ufosforylowaniu podlegały białka o masach cząsteczkowych pomiędzy 100 a 13 kDa. Wykazano zróżnicowane profile ufosforylowania białek, o masach 52, 51, 49, 43, 40, 29, 24, 18, 15 i 13 kDa, pochodzących z obu rodzajów nasienia **(Rycina 4.43, Rycina 4.44, Rycina 4.45, Rycina 4.46, Rycina 4.47, Rycina 4.48)**. Ilość niskocząsteczkowych fosfoprotein w plemnikach była wyższa w stosunku do plazm nasienia. Zanotowano także intensywniejszą fosforylację białek o średnich masach

cząsteczkowych, zwłaszcza w nasieniu z YSS **(Rycina 4.46, Rycina 4.47, Rycina 4.48)**. Co ciekawe w plemnikach nasienia białego i żółtego fosforylacji ulegały głównie reszty seryny i tyrozyny **(Rycina 4.43, Rycina 4.45, Rycina 4.46, Rycina 4.48)**. Zauważono znaczący wpływ sezonu na stopień nasilenia fosforylacji wybranych białek ejakulatu indora. Ekspresja niektórych z nich była wyższa w sezonie wiosenno-letnim niż w jesienno-zimowym bez względu na rodzaj nasienia, z którego pochodziły **(Rycina 4.43, Rycina 4.44, Rycina 4.45, Rycina 4.46, Rycina 4.47, Rycina 4.48)**. Kilka białek plemnikowych również podlegało fosforylacji najprawdopodobniej zależnej od sezonu. Były to białka o masach cząsteczkowych wynoszących 71,4; 40,9; 27,5; 15,4 oraz 7,4 kDa. Omawiane białka podlegały różnym stopniom ufosforylowania na wybranych resztach aminokwasowych, które potwierdziły średnie wartości gęstości optycznej **(Tabela 4.98, Tabela 4.99, Tabela 4.100)**.

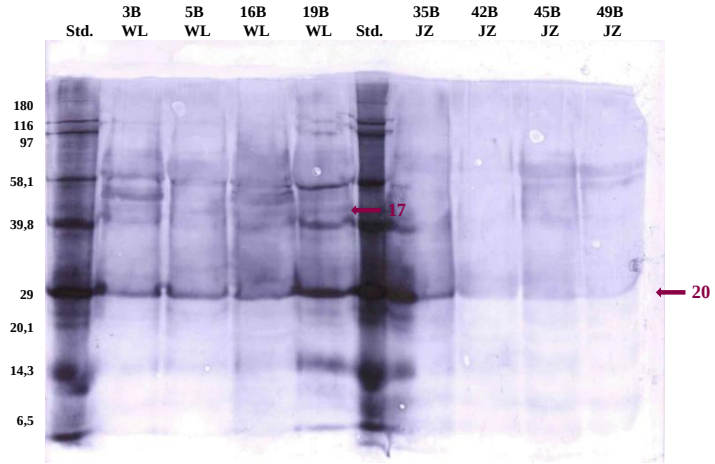
Analizując gęstości optyczne wybranych frakcji w plemnikach z nasienia z syndromem YSS stwierdzono bardziej nasiloną fosforylację reszt fosfotreonylowych w białkach o masach 52, 51, 49, 43 i 29 kDa. Nie zanotowano natomiast różnic statystycznie istotnych w poziomie ufosforylowania reszt serylowych i tyrozylowych pomiędzy badanymi rodzajami nasienia (**Tabela 4.97**). Sezon wiosenno-letni istotnie wpływał na nasilenie ekspresji reszt fosfoserylowych, fosfotreonylowych i fosfotyrozylowych w białkach 52, 51, 49, 43, 24, 18 i 13 kDa oraz reszt fosfoserylowych i fosfotyrozylowych w białkach 40, 29 i 15 kDa bez względu na rodzaj nasienia (**Tabela 4.98**).



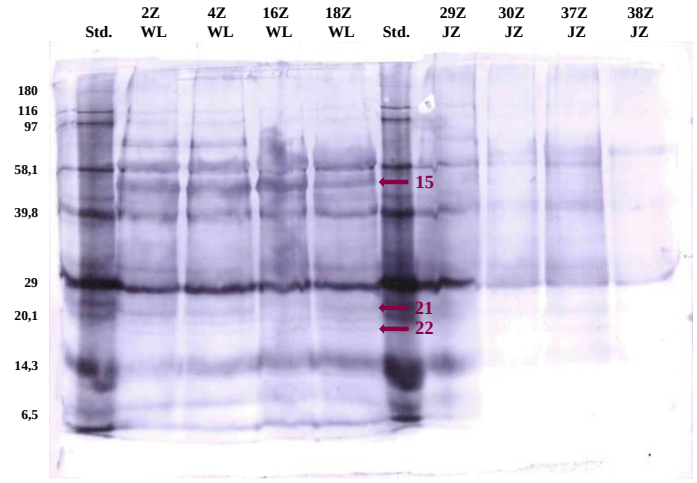
Rycina 4.43 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych



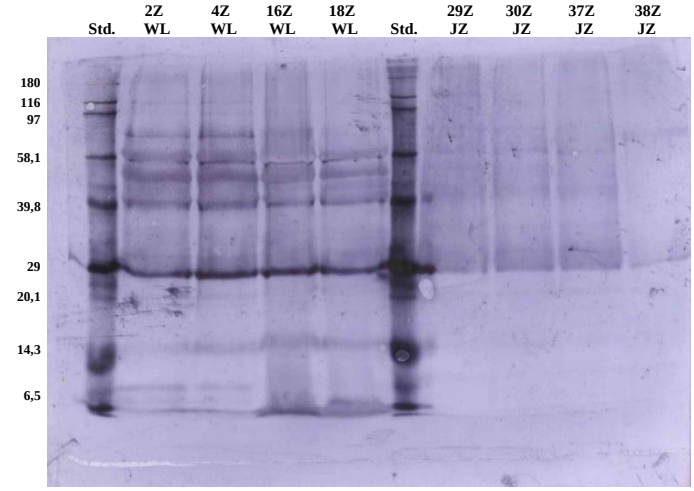
Rycina 4.44 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych



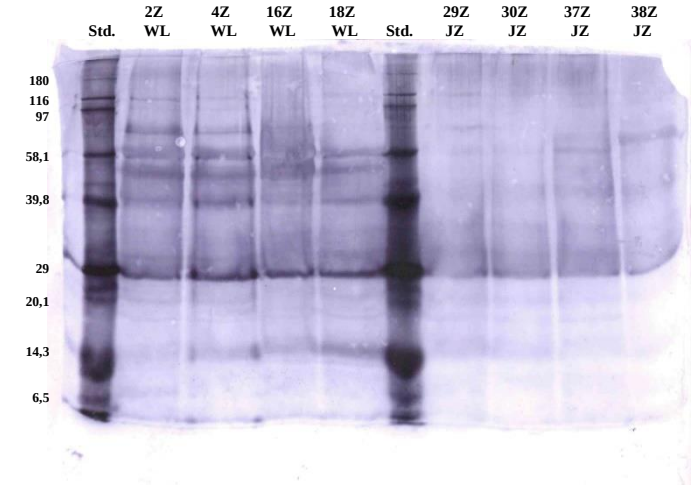
Rycina 4.45 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych



Rycina 4.46 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z żółtych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych



Rycina 4.47 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z żółtych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych



Rycina 4.48 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z żółtych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych

Tabela 4.97 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego i żółtego nasienia. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM. Kolorem bordowym zaznaczono różnice statystycznie istotne pomiędzy rodzajami nasienia w obrębie jednej ufosforylowanej reszty

Białko	Masa cząsteczkowa wg Multi-Analyst	Ufosforylowana reszta	Rodzaj nasienia	Średnia arytmetyczna	± SEM
15	52 kDa	SER	B	0,17	0,03
			Z	0,16	0,04
		THR	**B**	**0,16**	**0,02**
			Z	**0,27**	**0,03**
		TYR	B	0,14	0,04
			Z	0,20	0,03
16	51 kDa	SER	B	0,18	0,03
			Z	0,17	0,04
		THR	B	0,17	0,03
			Z	0,27	0,03
		TYR	B	0,16	0,05
			Z	0,21	0,03
17	49 kDa	SER	B	0,18	0,03
			Z	0,15	0,03
		THR	B	0,18	0,03
			Z	0,27	0,03
		TYR	B	0,15	0,04
			Z	0,20	0,03
18	43 kDa	SER	B	0,17	0,03
			Z	0,14	0,02
		THR	**B**	**0,16**	**0,02**
			Z	**0,25**	**0,02**
		TYR	B	0,13	0,03
			Z	0,18	0,02
19	40 kDa	SER	B	0,20	0,04
			Z	0,18	0,03
		THR	**B**	**0,17**	**0,03**
			Z	**0,27**	**0,03**
		TYR	B	0,16	0,04
			Z	0,20	0,03
20	29 kDa	SER	B	0,31	0,08
			Z	0,40	0,09
		THR	B	0,30	0,06
			Z	0,42	0,07
		TYR	B	0,29	0,07
			Z	0,33	0,06
21	24 kDa	SER	B	0,11	0,03
			Z	0,09	0,02
		THR	B	0,16	0,03
			Z	0,19	0,01
		TYR	B	0,11	0,02
			Z	0,10	0,02
22	18 kDa	SER	B	0,07	0,01
			Z	0,05	0,01
		THR	B	0,13	0,03
			Z	0,18	0,01
		TYR	B	0,07	0,02
			Z	0,08	0,01
23	15 kDa	SER	B	0,10	0,03

			Z	0,12	0,04
		THR	B	0,15	0,04
			Z	0,18	0,01
		TYR	B	0,08	0,03
			Z	0,10	0,02
		SER	B	0,04	0,01
			Z	0,05	0,02
24	13 kDa	THR	B	0,14	0,03
			Z	0,16	0,01
		TYR	B	0,07	0,02
			Z	0,06	0,01

Tabela 4.98 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia pobranego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM. Kolorem bordowym zaznaczono różnice statystycznie istotne pomiędzy sezonami, z których pochodziły ejakulaty w obrębie jednej ufosforylowane reszty

Białko	**Masa cząsteczkowa wg Multi-Analyst**	**Ufosforylowana reszta**	**Sezon**	**Średnia arytmetyczna**	**± SEM**
15	52 kDa	**SER**	**WL**	**0,24**	**0,02**
			JZ	**0,09**	**0,02**
		THR	**WL**	**0,28**	**0,03**
			JZ	**0,15**	**0,02**
		TYR	**WL**	**0,25**	**0,03**
			JZ	**0,09**	**0,01**
16	51 kDa	**SER**	**WL**	**0,26**	**0,02**
			JZ	**0,09**	**0,02**
		THR	**WL**	**0,29**	**0,03**
			JZ	**0,15**	**0,02**
		TYR	**WL**	**0,27**	**0,03**
			JZ	**0,09**	**0,01**
17	49 kDa	**SER**	**WL**	**0,24**	**0,02**
			JZ	**0,09**	**0,02**
		THR	**WL**	**0,30**	**0,03**
			JZ	**0,15**	**0,02**
		TYR	**WL**	**0,26**	**0,03**
			JZ	**0,09**	**0,01**
18	43 kDa	**SER**	**WL**	**0,20**	**0,02**
			JZ	**0,11**	**0,02**
		THR	**WL**	**0,24**	**0,02**
			JZ	**0,16**	**0,02**
		TYR	**WL**	**0,21**	**0,01**
			JZ	**0,10**	**0,02**
19	40 kDa	**SER**	**WL**	**0,26**	**0,03**
			JZ	**0,12**	**0,03**
		THR	**WL**	**0,29**	**0,03**
			JZ	**0,15**	**0,02**
		TYR	**WL**	**0,26**	**0,02**
			JZ	**0,10**	**0,02**
20	29 kDa	**SER**	**WL**	**0,49**	**0,04**
			JZ	**0,21**	**0,08**
		THR	**WL**	**0,51**	**0,05**
			JZ	**0,21**	**0,03**

		TYR	**WL**	**0,47**	**0,03**
			JZ	**0,15**	**0,02**
21	24 kDa	SER	WL	0,13	0,01
			JZ	0,07	0,03
		THR	**WL**	**0,21**	**0,02**
			JZ	**0,14**	**0,01**
		TYR	**WL**	**0,15**	**0,02**
			JZ	**0,06**	**0,01**
22	18 kDa	**SER**	**WL**	**0,08**	**0,01**
			JZ	**0,04**	**0,01**
		THR	**WL**	**0,19**	**0,02**
			JZ	**0,12**	**0,01**
		TYR	**WL**	**0,10**	**0,01**
			JZ	**0,04**	**0,01**
23	15 kDa	**SER**	**WL**	**0,15**	**0,03**
			JZ	**0,07**	**0,03**
		THR	**WL**	**0,21**	**0,03**
			JZ	**0,12**	**0,01**
		TYR	**WL**	**0,13**	**0,02**
			JZ	**0,04**	**0,01**
24	13 kDa	SER	WL	0,06	0,01
			JZ	0,03	0,01
		THR	WL	0,18	0,03
			JZ	0,11	0,01
		TYR	**WL**	**0,10**	**0,02**
			JZ	**0,03**	**0,01**

4.10. Charakterystyka zidentyfikowanych fosfoprotein

Dzięki danym znalezionym w ogólnodostępnych bazach proteomicznych dokonano syntetycznego opisu miejsc fosforylacji zidentyfikowanych fosfoprotein **(Tabela 4.99)** oraz ich funkcji i lokalizacji komórkowej **(Tabela 4.100)**.

Tabela 4.99 Miejsca fosforylacji zidentyfikowanych fosfoprotein

Zidentyfikowane białko	Gen kodujący	Miejsca fosforylacji	Wiązane związki	Dodatkowe informacje
Akrozyna	ACR	S48, T287, T356	Jony Ca^{2+} i Zn^{2+}	Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;
Aktyna*	ACTA1	T7, T8, S35, S54, Y55, S62, T68, Y71, T79, T91, Y93, Y145, Y168, Y171, T188, Y190, T196, Y200, S201, T205, Y220, S235, S236, S241, Y242, T251, T262, S267, Y281, Y296, T306, Y308, T320, S325, T326, T360, Y364	ATP	
	ACTA2	S35, S54, Y55, S62, T68, Y71, T79, Y145, Y168, Y171, T188, Y190, Y200, S201, Y220, S235, S236, S241, Y242, T251, T262, S267, Y281, T320, S325, T326, Y364	ATP	
	ACTB	S14, S33, S52, Y53, S60, Y69, T77, T89, Y91, T106, Y143, S155, T162, Y166, Y169, T186, Y188, Y198, S199, T201, T202, T203, Y218, T229, S233, S235, S239, Y240, T249, S265, S271, Y294, T297, S300, Y306, T318, S323, T324, Y362, S365	ATP	
	ACTC	T7, T8, S35, S54, Y55, S62, T68, Y71, T79, T91, Y93, Y145, Y168, Y171, T188, Y190, T196, Y200, S201, T205, Y220, S235, S236, S241, Y242, T251, T262, S267, Y281, Y296, Y308, T320, S325, T326, Y364	ATP	
	ACTG ACTG1	S14, S33, S52, Y53, S60, Y69, T77, T89, Y91, T106, Y143, S155, T162, Y166, Y169, T186, Y188, Y198, S199, T201, T202, T203, Y218, S233, S235, S239, Y240, T249, S265, S271, Y294, T297, S300, Y306, T318, S323, T324, Y362, S365	ATP	
	ACTG2	S34, S53, Y54, S61, T67, Y70, T78, Y144, Y167, Y170, T187, Y189, T195, Y199, S200, T204, Y219, S234, S235, S240, Y241, T250, T261, S266, Y280, Y295, Y307, T319, S324, T325, Y363	ATP	
	ACT5	T7, T8, S14, S33, S35, S52, Y53, S54, Y55, S60, S62, T68, Y69, Y71, T77, T79, T89, T91, Y93, T106, Y1445, Y168, Y171, T188, Y190, T196, Y200, S201, Y220, S235, S236, S241, Y242, T251, T262, Y281, T320, S325, T326, Y364	ATP	
Albumina*	ALB	S14, S15, Y17, S18, S29, Y54, T71, S82, S89, T92, T107, Y108, Y162, Y164, Y172, Y174, Y185, T190, S216, S217, S244, S256, T260, T263, Y287, S294, S296, S297, S311, S328, S336, Y343, Y365, S366, T376, Y377, T379, T380, Y394, Y425, Y436, S443,	Jony Ca^{2+}, Zn^{2+}, Na^{+} i K^{+}	Glikoproteina; Fosforylacja wybranych miejsc decyduje o rodzaju aktywności białka;

		T444, T446, S451, Y476, S494, T498, T502, S504, S513, T520, Y521, T551, T564, T590, S603		
Aldolaza C fruktozo-bisfosforanowa*	ALDOC	S4, Y5, S36, S39, S45, T52, T119, S132, T158, S160, S176, Y204, Y214, S218, Y223, T235, T253, T255, S281, S356, Y358, Y364		
Alfa-aktynina 1	ACTN1	Y13	Jony Ca^{2+}	
Alfa-aktynina 4*	ACTN4	Y4, Y11, Y13, Y31, T69, S121, S159, S191, Y212, Y234, T249, Y260, S262, S263, Y265, S269, Y298, S303, T312, T324, S367, S381, Y397, S423, T429, Y441, T445, S447, S461, Y485, Y486, S488, T493, S507, T509, S511, Y533, S608, Y611, T612, T615, S621, S642, S656, T667, T682, Y693, S696, Y700, Y727, T741, T756, S763, S773, S796, T839, T840, T842, T844, Y886, Y898, Y906, S909	Jony Ca^{2+}	
Alfa-enolaza*	ENO1	S2, S14, T19, T26, S27, S37, S40, T41, Y44, T55, Y57, S63, T72, S79, T100, S115, Y131, S141, S157, Y189, T205, T229, Y236, T237, S254, Y257, S263, S268, Y270, S272, Y280, S282, Y287, S291, T308, S310, S336, S349, T351, S353, S370, S373, Y407, S419,	Jony metali	
Aminopeptydaza Ey*	ANPEP	Y6, S43, T63, S124, Y161, T209, Y441, S451 S452, T457, S460, S488, T535, Y582, T589, S590, Y600, S670, T727, Y913, T928, S932, T934	Jony Zn^{2+}	Glikoproteina
Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)*	GOT1	Y41, S66, Y71, S93, S138, T140, S149, S158, S211, S224, Y226, Y264, T295, S297, S312, T333, Y373, Y381, S385, S391, Y400, T403		
Aminotransferaza aspraginianowa (forma mitochondrialna)*	GOT2	T48, Y67, Y75, S79, Y96, S118, T128, S133, T135, S143, T161, T166, T192, S199, T231, Y284, S306, Y316, S317, T333, S360, S399, Y401, S409, S415	Fosforan pirydoksalu	
Aneksyna A1	ANXA1	S24	Jony Ca^{2+}	
Aneksyna A2	ANXA2	T24, T26	Jony Ca^{2+}	
Anhydraza węglanowa-2*	CA2	S2, S29, T35, Y40, S48, S50, Y51, T87, S99, Y114, S151, S165, S172, S216	Jony Zn^{2+}	
Apolipoproteina A1*	APOA1	Y53, S55, S60, S76, S166, T185, Y190, S191, Y216, T226		
ATPaza 13A4 transportująca kationy*	ATP13A4	S257, T262, T289, T336, S470, S602, S603, T609, T672, T699, S708, T713, T717, Y775, S783, S799, S804, T819	Jony metali ATP	
ATP-zależna helikaza RNA DDX1*	DDX1	Y65, T80, T83, S86, Y96, S106, S155, T170, S206, S259, T280, T295, T346, T362, S377, Y380, S381, S436, S481, Y496, S541, Y586, T591, T621, Y628, S632, S633, S671, T689, Y690, S700, Y731	ATP	

Awidyna	AVD	Brak	Biotyna	Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;
Białko 1 aparatu Golgiego*	GLG1	S117, S262, Y370, Y383, S417, T486, Y551, Y564, S714, Y878, T922, T927, S961, Y999		Glikoproteina
Białko 1 dla receptora LDL*	LRP1	T3, S511, Y530, T648, T1404, S1409, S1417, S1419, T1430, S1432, T1440, Y1443, T1498, T1500, T1513, Y1557, Y1587, S1754, T1790, Y2000, S2004, T2156, Y2290, S2559, Y2560, S2563, S2621, S3142, T3261, S3604, S3771, S3777, S3928, S4067, S4071, S4249, T4255, T4460, Y4473, Y4507, Y4511, S4517, S4520, S4523, T4524	Jony Ca^{2+}	Glikoproteina
Białko 14-3-3 beta	YWHAB	S184		
Białko 14-3-3 epsilon*	YWHAE	Y9, T38, S46, Y49, S59, S64, S65, T91, T114, S117, Y122, Y131, T137, S148, Y152, Y181, T208, S210, S213, Y214, T232, S233		
Białko 14-3-3 gamma*	YWHAG	Y20, T31, S38, S46, Y49, S59, S64, S65, S71, S113, T115, Y117, S119, Y131, Y133, T139, Y154, S155, T168, Y179, S180, T199, T210, S215, Y216, T234, S235		
Białko 14-3-3 teta*	YWHAQ	Y19, T24, S37, S45, Y48, S57, S63, S64, Y82, S88, S92, T110, S114, Y128, T141, S145, Y149, S156, T205, S210, Y211, T229, S230, S232		
Białko 14-3-3 zeta*	YWHAZ	Y19, S28, S37, S45, Y48, S57, S63, S64, Y82, T88, S99, S110, S114, Y126, Y128, S145, Y149, Y179, S184, T194, T205, S207, S210, Y211, T226, T229, S230, T232		
Białko 18 towarzyszące spermatogenezie*	SPATA18	T13, S85, T87, S115, S156, S159, S202, Y229, S257, S259, S261, S274, S276, S287, S507, S509, S523, S525, S527, S529		
Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego*	VDAC2	T7, T44, S46, S48, T54, S55, S57, S58, T66, T68, Y73, Y78, T109, T112, T113, S115, T118, S128, Y184, T199, Y206, Y236, S245, S251, S252, Y258, T259, T261, S278,		
Białko 20 towarzyszące witce*	CFAP20	Y86, T112, T120, S173, Y184		
Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną*	RPS27A	T14, S20, T22, S57, Y59, S65, S84, Y85, T87, Y106, S115, S123, Y140, T147, Y148	Jony metali	
Białko 2 zewnętrznego włókna osiowego plemnika*	ODF2	S4, S14, S22, S37, T41, T52, S58, S73, S74, T92, S95, S96, S101, S106, S109, T110, S115, S129, S139, T193, T231, T248, S261, S283, S302, S339, S341 T478, S489, S632, S759, S786, S792, S820		
Białko 4B ciałka wielopęcherzykowego*	CHMP4B	S2, S87, T103, Y111, S184, T188, S196, S201, S223		
Białko 4 wiążące retinol*	RBP4	Y108, Y191, S196		Posiada wiązania disiarczkowe
Białko 50A kontrolujące cykl komórkowy*	TMEM30A	Y5, S89, Y121, Y122, Y128, S313, T360		Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe

Białko chaperonowe 70 (forma mitochondrialna)	HSPA9	T87, S408	ATP	
Białko NEL	NEL	Y350, Y359, T770	Jony Ca^{2+}	Glikoproteina Posiada domenę wiążącą czynnik elongacyjny 2
Białko podobne do alfa-1 kwaśnej glikoproteiny 2	ORM2	Y109, Y175		Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe
Białko RAP1B z rodziny Ras	RAP1B	S179	GTP	Lipoproteina
Białko RAB10 z podrodziny Ras*	RAB10	T5, Y6, S18, T41, T50, T65, T73, T76, S77, T165, T174, S181, S187, S188, T193	GTP	Lipoproteina
Białko RAB2A z podrodziny Ras*	RAB2A	Y3, T15, S67, S70, Y86, T89, S108, S154, T163	GTP	Lipoproteina
Białko RAB5B z podrodziny Ras*	RAB5B	T6, S29, Y82, S84, S123, S125, S184, S205	GTP	Lipoproteina
Białko Ran wiążące GTP*	RAN	T21, T24, T25, T32, Y39, S135, Y146, Y147, S150, Y155	Jony metali GTP	
Białko RhoC wiążące GTP*	RHOC	T19, S26, Y34, Y66, S152, Y156, S160	GTP	Lipoproteina
Białko SPARC*	SPARC	Y145	Jony Ca^{2+}	Glikoproteina Posiada wiązania disiarczkowe;
Białko szoku termicznego 70 kDa*	HSP70	T13, Y15, S16, T37, S40, Y41, T45, T47, T66, S85, S106, Y107, T140, T145, Y149, S153, Y183, T222, T226, S254, T265, S362, Y371, S418, T502, Y525, S537, S544, Y545, S551, S579, S608, Y611, S631, S633, T636	ATP	
Białko szoku termicznego 71 kDa*	HSPA8	S2, T13, Y15, S16, T37, S40, Y41, T45, T47, T64, T66, S85, Y107, T111, S113, Y134, T138, T140, Y149, S153, T158, T163, T177, Y183,S221, T226, S254, T265, T273, S277, T313, S329, T341, S362, Y371, S381, S400, T405, T411, T427, Y431, T462, T477, T502, S511,Y525, S541, S544, Y545, T608, S637, S638, T641	ATP	
Białko szoku termicznego 90 kDa – alfa*	HSP90AA1	T5, T7, T36, Y38, S52, S53, Y61, S63, T65, T88, T90, T99, T109, T115, Y160, S164, T195, Y197, S211, Y216, T219, S231, S252, S263, Y284, T293, T305, Y309, Y313, S315, T317, S391, S399, S406, T425, Y434, Y438, S442, S453, Y465, Y466, T467, S468, S470, S476, Y480, T482, Y492, Y493, T495, T498, S505, T540, S543, T566, S589, S595, T601, S602, T603, Y604, T607, S623, T624, Y627, S641, S645, T669, Y689, T704, T708, S709, T725, S726	ATP	

Białko szoku termicznego 90 kDa – beta	HSP90AB1	S226, S255	ATP	
Białko wiążące kwasy tłuszczowe*	FABP7	T54, T57, T61, T117, T119, Y129		
Białko wiążące osłonę przejrzystą 1*	ZPBP1	T16, S21, T249		Glikoproteina;
Białko z rodziny 2 rozpuszczalnych transporterów, ułatwiające transport glukozy*	SLC2A3	T232, S236, S475, S485, T492	Glukoza	Glikoproteina;
Białko z rodziny polipeptydów posiadających domenę EF*	EFHC2	Y168, S382, Y509, Y519, T538, S544		
Chaperon BIP z retikulum endoplazmatycznego*	HSPA5	S4, S14, T37, Y39, T62, S64, Y65, T69, T85, S86, T91, S107, T124, Y127, T139, S146, T156, Y160, Y175, T189, Y209, T229, S300, S311, Y313, S319, S354, S365, T366, T441, S448, S452, T453, S455, T460, Y466, T518, T525, T527, T534, S567, Y568, Y570, S571, S587, S588, S607, S632, Y635, S637, T643, T648	ATP	
Cytoplazmatyczna hydrataza akonitanowa (akonitaza)*	ACO1	S30, S138, Y184, T258, T318, Y336, S383, Y466, Y480, S622, T628, S638, S645		
Czynnik 5 ADP-rybozylacji*	ARF5	T4, S6, S10, Y35, S103, S137, T140, T152	GTP	Lipoproteina
Czynnik elongacyjny alfa-1*	EEF1A	S21, T22, T23, T24, Y29, Y56, S76, T82, Y85, Y86, T88, S128, Y141, T142, S157, T158, Y162, S163, Y167, S175, T176, Y177, S224, T239, T242, Y254, T261, T269, T286, S291, S300, S316, S329, S354, Y357, T365, S383, S396, S414, S416, Y418, T432, T452, S454	GTP	W pozycji 301 i 374 dołączone reszty 5-glutamylo-glicerolo-fosforyloetanoloaminy (w białku kury domowej)
Czynnik elongacyjny II	EEF2	T57, T59	GTP	
Czynnik NHE-RF1 regulujący wymianę jonów Na^+/H^+*	NHERF1	S2, Y38, S46, S77, T95, T156, S162, Y164, S170, S173, S181, S186, S191, S217, S247, T260, S269, S280, S288, S290, S291, T293, S294, S299, S302, S308, T309, S313, S317, S326, S339, S340, S349		
Cytochrom C*	CYC	T29, T41, Y47, S48, Y49, T50, Y68, Y75, T79, Y98	Jony metali	
Deglikaza DJ-1 białek/kwasów nukleinowych	PARK7	Y67		Lipoproteina
Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego*	GAPDH	T19, S25, Y42, Y45, Y49, S51, T52, T59, T75, S83, Y94, S98, T99, T103, T104, S122, S125, Y140, S148, S151, T153, T154, T176, T177, T182, T184, T187, S192, S210, T211, T229, T237, S241, T246, Y255, S266, Y276, S284, S312, Y314, Y320, S321, S333	NAD^+	

Dehydrogenaza bursztynianowa*	SDHA	S8, T24, Y169, S177, Y215, S243, S321, Y365, Y436, S456, S505, S509, S530, Y543, Y604, Y606, S628, Y629, T638, Y641	FAD	Fosforylacja niezbędna do transportowania elektronów przez kompleks II
Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)*	MDH1	Y22, S23, S28, T71, S89, S111, Y119, T174, S188, S189, T190, Y192, Y210, S217, S241, S242, S245, T296, S309, S321, S326, S332, S333	NAD^+	
Dehydrogenaza mleczanowa (łańcuch A)*	LDHA	T3, Y10, T18, S38, T74, Y83, S89, Y127, S128, T144, Y145, S161, Y172, S184, T213, S237, Y239, T248, S249, Y281, T309, S310, S319, T322	NAD^+ Kadheryna	
Dehydrogenaza mleczanowa (łańcuch B)*	LDHB	T18, S39, S44, T75, Y84, S85, S90, T96, S106, Y128, S129, S162, Y173, S238, Y240, Y248, T249, S269, S291, T302, S303, S320, T323	NAD^+ Kadheryna	
Fibronektyna*	FN1	S41, Y101, Y106, Y112, T136, Y372, Y588, Y641, T715, S904, S932, T935, Y937, T960, S968, T972, Y1042, S1075, S1122, Y1206, T1362, T1553, T1834, T1853, T1877, S1924, T1931, T1933, T1946, T1951, Y1970, Y1975, S2073, S2284, Y2349, Y2403, S2432, S2440, Y2441, Y2444, S2445, T2454, S2475		Glikoproteina Fosforylacja wybranych miejsc decyduje o rodzaju aktywności białka;
Fosfataza gamma białek tyrozynowych typu receptorowego*	PTPRG	T115, Y132, S245, Y250, S320, S325, Y419, S433, S436, T681, S708, S782, S815, Y880, Y886, Y906, Y911, Y1021, Y1023, Y1034, Y1164, S1182, Y1307, S1409, S1435, S1440, S1443		Glikoproteina
Fosfataza eta białek tyrozynowych typu receptorowego*	PTPRJ	S226, T233, S652, S692, S1009, S1011, Y1071, Y1077, T1091, Y1094, Y1099, Y1103, S1105,Y1133, T1139, Y1225, Y1311, T1314, T1318, Y1320		Glikoproteina
Fosfolipaza C zeta-1*	PLCZ1	Y457, Y582		
Gamma- glutamylotransferaza 2 białko-glutamina*	TGM2	S56, T58, S60, S68, Y159, T162, S212, S215, S216, Y219, Y245, Y250, Y315, T368, Y369, S415, S419, S427, S449, S538, S541, Y575, Y583, S608 (w białku człowieka)	GTP; Jony Ca^{2+}	
Gelsolina*	GSN	S35, S51, Y86, S261, T265, T309, S313, T361, T386, S408, Y409, S455, Y465, S473, Y478, Y480, S537, T558, S562, S590, S600, Y603, S611, S636, Y651, T653, S654, Y730, T742	Aktyna Jony Ca^{2+}	
GTPaza HRAS*	HRAS	Y32, T35, S39, Y40, Y64, Y96, Y137, T144, S145, T148, Y157, T158, S177, S183	GTP	Lipoproteina
GTPaza NRAS*	NRAS	Y32, S39, Y40, Y64, S89, Y157, T158	GTP	Lipoproteina
Homolog białka 42 odpowiadającego za (kontrolujący) podziały komórkowe*	CDC42	T17, S22, Y23, T24, T25, S30, Y32, T35, Y40, T43, Y51, T52, T58, Y64, S71, S88, S89, T141, Y154, T161	GTP	Lipoproteina

Inhibitor 2 metaloproteinaz*	TIMP2	S57, Y62, Y90, Y165	Jony Zn^{2+}	Posiada wiązania disiarczkowe
Izomeraza triozofosforanowa*	TPI1	S21, T28, Y48, Y68, T71, S80, T90, S106, T140, S159, Y165, T173, T178, S195, S198, S204, Y209, S212, T214, T217, S223		
Kalmodulina*	CALM CCM1	S18, T29, T30, T45, T80, S82, Y100, S102, T111, T118, Y139, T147	Jony Ca^{2+}	
Katepsyna D*	CTSD	S37, S42, S230, Y232, T250, S252, Y325, S333, T334, T339, Y347, Y354, Y394		Glikoproteina
Kinaza białek tyrozynowych typu protoonkogenowego	ROS1	Y2131	ATP	Glikoproteina
Kinaza difosforanów nukleozydów*	NDK	S44, Y52, Y67, T94, S99, S120, S122, S125, Y151	Jony metali ATP	
Kinaza fosfoglicerynianowa*	PGK	S2, S4, T35, S46, S62, Y76, S77, S87, S115, S136, S153, S155, Y161, T168, S175, Y196, S203, T243, S256, S271, T281, T288, S305, S320, S321, Y324, T378, S390, S399, S415	ATP	
Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	T282, S285, T289	ATP	
Kinaza kreatynowa podtyp M*	CKM	Y14, Y20, S24, T35, Y39, Y125, S128, S129, S136, Y140, T141, S164, T166, Y173, Y174, S178, T180, S199, S224, Y279, T282, S285, T289, T313, T322, T327, S332, S372	ATP	
Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)*	CKMT2	Y73, Y85, T143, S148, T151, Y159, S162, S163, Y207, Y208, S211, T214, Y255, S319, S343, T356, T361, Y368, S371, Y393	ATP	
Kinaza pirogronianowa*	PKM	S2, S6, T25, S37, T41, T45, T50, S55, S57, T60, S77, T80, Y83, T87, T93, T95, S97, S100, Y105, T121, S127, T129, T143, Y148, Y161, S172, Y175, S182, T195, S202, S205, S222, S243, S249, S269, S287, T328, S346, S362, Y370, nY390, T409, T412, S420, S425, T432, S434, S437, Y444, T454, T459, Y466, T513, S519, T524	Jony K^+ i Mg^{2+} ATP	
Kinaza UMP/CMP*	CMPK	S33, Y49, Y56, T68, S70, T79, T107, S147, Y166, S180	ATP	
Klusteryna*	CLU	T69, S72, T88, S133, S161, S185, S310, S314, T315, S319, T387, S391, T393, S394, S396, S412, T433		Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;
Kofaktor NHE-RF1 regulujący wymianę jonów Na^+/H^{+*}	SLC9A3R1	S2, Y38, S46, S77, T95, T156, S162, Y164, S170, S173, S181, S186, S191, S217, S247, T260, S269, S280, S288, S290, S291, T293, S294, S299, S302, S308, T309, S313, S317, S326, S339, S340, S349		
Lizozym G*	LYG	S94, S141, T165, S181		Posiada wiązania disiarczkowe;
Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1*	COL12A1	T67, T217, S273, S381, S661, S765, T778, T786, T802, S920, Y924, T926, S927, T1082, S1101, S1102, T1217, S1220, S1223, S1261, T1292, S1312, T1397, Y1415, Y1419, Y1420, S1423, S1433, S1438, Y1450, T1743, Y1897, T2062, S2125, Y2146, T2231, T2243, T2433,		Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;

		S2437, S2536, S2541, S2591, Y2667, S2861, S2864, S2952, S2994, Y3043, S3062		
Łańcuch alfa-1 tubuliny*	TBA1	S6, T41, S48, T51, S54, T56, T73, T80, T82, Y83, T94, Y103, Y108, T109, S158, Y161, S165, Y210, T223, Y224, T225, S237, Y272, S277, Y282, S287, Y312, Y319, T334, T337, T340, Y357, T361, Y399, S419, Y432, S439, Y451	GTP Jony Mg^{2+}	Podlega odwracalnej reakcji tyrozylacji C końca białka
Łańcuch alfa-2 tubuliny	TBA2	T349	GTP Jony Mg^{2+}	Podlega odwracalnej reakcji tyrozylacji C końca białka
Łańcuch alfa-4 tubuliny (fragment)*	TBA4	S6, Y24, T41, S48, T73, T94, Y103, Y108, T109, S158, Y161, Y185, T190, T191, Y210, T223, Y224, T225, S232, Y262, Y272, S277, Y282, S287, Y312, Y319, S340, Y357, T361, S379, Y399, S419, Y432, S439, Y440	GTP	
Łańcuch alfa-5 tubuliny	TBA5	T349	GTP Jony Mg^{2+}	Podlega odwracalnej reakcji tyrozylacji C końca białka
Łańcuch alfa-8 tubuliny*	TBA8	S48, T56, T82, T94, Y103, S165, Y210, T223, Y224, T225, S232, T340, Y357, T361, Y399, S419, T437, S439	GTP Jony Mg^{2+}	
Łańcuch beta-1 tubuliny*	TBB1	Y55, Y159, S168, Y208, S278, Y281, T439	GTP Jony Mg^{2+}	
Łańcuch beta-2 tubuliny*	TBB2	Y36, Y50, Y51, T72, S75, S78, S95, Y106, T107, S115, S126, Y159, S172, Y208, T218, T219, T221, Y222, T274, S275, S278, S338, S339, Y340, S382, T386	GTP; Jony Mg^{2+}	
Łańcuch beta-3 tubuliny*	TBB3	S48, T72, S75, Y106, T107, S115, T149, S168, S172, Y208, T219, Y222, T274, Y310, T312, T315, S322, S338, S339, Y340, S364, S365, S382, T386, S444	GTP; Jony Mg^{2+}	
Łańcuch beta-4 tubuliny*	TBB4	T35, Y36, S40, Y50, Y51, T55, Y59, S75, S78, S95, T107, S126, T136, S138, T143, S145, S168, S172, Y208, T218, T219, T221, Y222, T274, S275, S278, T290, Y310, T312, S332, S335, S338, S339, Y340, T366, S371, S382, T386	GTP; Jony Mg^{2+}	
Łańcuch beta-5 tubuliny*	TBB5	S25, T33, T35, Y36, S40, S48, Y50, Y51, T55, Y59, T72, S75, S78, S95, Y106, T107, S115, S126, T136, S138, T143, S145, Y159, T166, S168, S172, Y208, T218, T219, T221, Y222, T274, S275, S278, Y281, T285, T290, Y310, T312, S338, S339, Y340, T366, S371, S382, T386, T409, S420, Y422, Y425, T429	GTP; Jony Mg^{2+}	
Łańcuch beta-6 tubuliny*	TBB6	Y36, S40, Y50, S55, S56, Y106, T107, S172, Y208, T219, Y222, T274, S275, Y310, T315, S338, S339, Y340, S365	GTP; Jony Mg^{2+}	
Łańcuch beta-7 tubuliny*	TBB7	S40, T55, S172, T285, T290, S444	GTP; Jony Mg^{2+}	

Łańcuch ciężki ferrytyny*	FTH	S5, T6, S7, Y13, S96, S114, T136, Y138, S164, Y169, T175, S179, S183	Jony Fe^{3+}	
Łańcuch C immunoglobuliny lambda*	LAC	S86		Posiada wiązania disiarczkowe
Łańcuch lekki immunoglobuliny ze stałym regionem*	IGLC3	S86		Posiada wiązania disiarczkowe
Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn*	ASTL	S99, Y112, S156, S244, Y279	Jony Zn^{2+}	Posiada wiązania disiarczkowe
Miozyna-9*	MYH9	Y9, Y11, S36, S39, S45, Y130, S131, Y138, Y151, Y158, S160, S169, T173, Y190, Y193, S196, Y278, T290, S344, S364, S375, T383, T391, S541, T552, S628, T638, Y721, T725, S728, S751, Y754, S759, T807, S841, T869, S876, S957, T969, T1006, T1009, S1015, S1017, T1030, S1114, S1122, T1151, T1155, T1182, S1195, S1243, T1269, T1286, S1290, S1294, S1304, S1308, S1326, S1328, S1340, S1376, T1382, S1398, Y1408, T1416, S1435, S1457, Y1460, S1511, S1519, S1526, T1551, S1580, S1606, S1628, S1677, S1713, S1714, S1745, T1800, S1803, Y1805, S1808, T1810, Y1861, S1892, T1904, T1906, S1915, S1916, S1943	Kalmodulina ATP	
Mitochondrialny antyport H^+/Ca^{2+}*	LETM1	S3, S8, S37, S126, Y141, S142, Y164, T175, S190, T192, S287, S337, T349, S580, S602, T643, S649, S666, S739	Jony Ca^{2+}	
Mutaza fosfoglicerynianowa 1	PGAM1	Y26		
Neuronalny czynnik regulujący NEGR1 (Neurotraktyna)*	NEGR1	Y61, T134, Y142, T163, Y187		Glikoproteina; Lipoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;
Oksydaza sulfhydrylowa 1*	QSOX1	T49, S255, Y300, S306, S426	FAD	Glikoproteina Posiada wiązania disiarczkowe;
Owotransferyna*	TRFE	T36, S63, Y64, S136, T139, S144, Y155, Y207, Y257, S298, S305, S306, T340, T349, T355, S389, S468, T476, S520, Y533, Y534, Y536, T537, Y593, T645, T654, Y666, Y669, Y674, S685, T686, S688, T694	Jony Fe^{3+}	Glikoproteina Posiada wiązania disiarczkowe; Fosforylacja wybranych miejsc decyduje o rodzaju aktywności białka;
Peptydylo-prolyl cis/trans izomeraza B*	PPIB	Y47, T72, T81, T108, Y119, Y133, S139, S150, S184, T185, T187, S189		Glikoproteina;
Peroksyredoksyna-1*	PRDX1	T18, S30, S32, Y34, S77, S80, T90, S106, T111, Y116, S126, T156, T166, S181, T183, Y194, S196		Posiada wiązania disiarczkowe;
Peroksyredoksyna-6	PRDX6	Y88, T176		

Podjednostka alfa-1 białka czapeczkującego F-aktynę*	CAPZA1	S9, T63, Y70, S106, S123, S126, Y198, S215, T224, Y239, Y247 (w białku człowieka)	Aktyna	
Podjednostka alfa-2 acetylohydrolazy IB czynnika aktywującego płytki (PAF)*	PAFAH1B2	S2, S6, S26, S64, T220		
Podjednostka alfa-2 białka czapeczkującego F-aktynę*	CAPZA2	S9, T63, T142, Y144, T180, Y198	Aktyna	
Podjednostka β-5 proteasomu (fragment)*	PSMB5	S87, Y99, S134, S139, Y147, Y149, T158, Y171, S175, Y212, Y220, Y228, Y236, S247, S248, S261, T262		
Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)*	ATP5F1B	T21, S23, S25, S51, T60, T110, T116, S128, T140, T185, Y196, T213, Y230, S231, T240, Y247, Y269, T288, Y292, T312, S316, S319, S327, Y331, T334, Y361, T374, Y395, S403, S415, Y418, S433, S447, S465, T475, Y499, S528, S529	ATP	
Podjednostka eta białka 1 T-kompleksu*	CCT7	T4, T13, S16, S24, S27, T57, S59, T64, S85, T129, S208, S221, Y222, T259, Y263, Y275	ATP	
Podjednostka flawoproteinowa A dehydrogenazy bursztynianowej*	SDHA	S8, T24, Y169, S177, Y215, S243, S321, Y365, Y436, S456, S505, S509, S530, Y543, Y604, Y606, S628, Y629, T638, Y641	FAD	
Podjednostka katalityczna beta fosfatazy PP1 serynowo-treoninowej białek*	PPP1CB	S41, S47, Y92, S128, Y133, Y136, T192, T197, S206, Y254, Y304, Y306, S311, T316	Jony Mn^{2+}	
Podjednostka Rieske kompleksu cytochromu b-c1 (forma mitochondrialna)*	UQCRFS1	S3, S16, T37, Y91, S99, T100, S102, T122, S157, S193	Centra żelazowo-siarkowe	Posiada wiązania disiarczkowe;
Podjednostka teta białka 1 T-kompleksu	CCT8	Y505	ATP Kadheryna	
Podjednostka zeta białka 1 T-kompleksu*	CCT6	T6, T82, Y109, T120, S175, S200, T204, S205, Y229, Y239, S246, Y250, S301, S306, T383, S527	ATP	
Podjednostka żelazowo-siarkowa dehydrogenazy bursztynianowej (forma mitochondrialna)*	SDHB	Y61, T119, Y206, Y216, S222	Centra żelazowo-siarkowe Ubichinon	
Podobny do SSC5D rozpuszczalny receptor nekrofagotyczny zawierający domenę bogatą w cysteinę	SSC5D	S174, T190, T718, S726, S917, S919, T928, S930		

Poliubikwityna B*	UBB	T7, T12, T14, S20, T22, S57, Y59, S65, T83, T88, T90, S96, T98, S133, Y135, S141, T159, T164, T166, S172, T174, S209, Y211, S217		
Proteaza cysteinowa ATG4B*	ATG4B	T7, Y8, S34, S44, Y122, Y123, S316, S383, S392		Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;
Radyksyna*	RDX	Y55, T66, Y128, Y134, Y137, Y270, Y291, T358, T369, S497, S532, S533, T542, T545, T564	Aktyna	
Receptor 1 transferyny	TFRC	S23		Glikoproteina; Lipoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;
Receptor sprzężony z białkiem G*	FZD7	S11, S27, Y35, S568		Glikoproteina; Posiada wiązania disiarczkowe;
S-transferaza glutationowa*	GST	Y9, Y49, S142, S202	Glutation	
Syntaza kwasów tłuszczowych	FASN	S2158	NADP	
Transtyretyna*	TTR	T23, T25, S72, Y125, S137, T138	T4	Glikoproteina

* wykorzystano bazy danych dla *Homo sapiens*

Tabela 4.100 Funkcje i lokalizacja komórkowa zidentyfikowanych fosfoprotein

Zidentyfikowane białko	Gen kodujący	Lokalizacja komórkowa	Funkcje
Akrozyna	ACR	Wydzielana zewnątrzkomórkowo Akrosom	Proteaza serynowa wykazująca specyficzność trypsynopodobną
Aktyna	ACTA1 ACTA2 ACTB ACTC ACTG ACTG1 ACTG2 ACT5	Cytoplazma Cytoszkielet Jądro komórkowe	Zaangażowana w ruchliwość plemników
Albumina	ALB	Wydzielana zewnątrzkomórkowo	Wiąże wodę, jony: Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, kwasy tłuszczowe, hormony, bilirubinę i leki; Bierze udział w regulacji ciśnienia osmotycznego krwi; Główny transporter jonów Zn^{2+} w plazmie (około 80%)
Aldolaza C fruktozo-bisfosforanowa	ALDOC	Cytoplazma	Enzym cyklu glikolitycznego
Alfa-aktynina 1	ACTN1	Cytoplazma Cytoszkielet Błona plazmatyczna	Bierze udział w zakotwiczaniu aktyny w strukturach wewnątrzkomórkowych
Alfa-aktynina 4	ACTN4	Jadro komórkowe Cytoplazma Połączenia międzykomórkowe	Bierze udział w zakotwiczaniu aktyny w strukturach wewnątrzkomórkowych Przyspiesza proces transkrypcji stymulowanej przez hormony steroidowe
Alfa enolaza	ENO1	Cytoplazma	Enzym ciągu glikolizy; Stymuluje produkcję immunoglobulin;
Aminopeptydaza Ey	ANPEP	Błona plazmatyczna	Hydrolizuje małe peptydy (4-5 aminokwasów); Uczestniczy w działaniu angiotensyny III i IV, neuropeptydów i chemokin; Najprawdopodobniej bierze udział w angiogenezie i krystalizacji cholesterolu
Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)	GOT1	Cytoplazma	Bierze udział w biosyntezie L-kwasu glutaminowego z L-kwasu asparaginowego i L-cysteiny; Ważny regulator poziomu biodostępnego glutaminianu

Aminotransferaza aspraginianowa (forma mitochondrialna)	GOT2	Matrix mitochondrium	Katalizuje odwracalną transaminację L-kinureniny do kwasu kinureninowego; Uczestniczy w transporcie metabolitów pomiędzy mitochondrium a cytozolem; Uczestniczy w transporcie kwasów tłuszczowych; Wiąże RNA
Aneksyna A1	ANXA1	Cytoplazma Jądro komórkowe Błona plazmatyczna Wydzielana zewnątrzkomórkowo Błona podstawna	Pełni rolę regulatora procesu zapalnego; Bierze udział w fagocytozie
Aneksyna A2	ANXA2	Wydzielana zewnątrzkomórkowo, Błona podstawna	Wiąże się z błoną plazmatyczną; Wiąże dwa jony wapnia; Jej aktywność wzmaga obecność anionowych fosfolipidów; Może uczestniczyć w wiązaniu się fosfolipidów błony plazmatycznej z aktyną i uczestniczyć w egzocytozie; Może uczestniczyć w odpowiedzi komórek na stres cieplny
Anhydraza węglanowa-2	CA2	Cytoplazma Błona plazmatyczna	Katalizuje odwracalną reakcję powstawania jonu wodorowęglanowego HCO_3- z wody i dwutlenku węgla; Odpowiedzialna za utrzymanie wewnątrzkomórkowego pH
Apolipoproteina A1	APOA1	Wydzielana zewnątrzkomórkowo	Uczestniczy w odwracalnym transporcie cholesterolu z tkanek do wątroby; Jest kofaktorem działania acylotransferazy lecytynowo-cholesterolowej (LCAT); Jako komponent kompleksu SPAP wzmaga ruchliwość plemników
ATPaza 13A4 transportująca kationy	ATP13A4	Błona plazmatyczna	Białko odpowiedzialne za transport międzybłonowy
ATP-zależna helikaza RNA DDX1	DDX1	Jądro komórkowe Cytoplazma Mitochondrium	Posiada aktywność nukleazową; Pozytywny regulator transkrypcji
Awidyna	AVD	Wydzielana zewnątrzkomórkowo	Formuje silne kompleksy z biotyną, rola biologiczna – nieznana
Białko 1 aparatu Golgiego	GLG1	Błona zewnętrzna aparatu Golgiego	Wiąże czynnik wzrostu fibroblastów oraz E-selektynę (lektyna występująca w komórkach endotelialnych; Uczestnicząca w adhezji wyżej wymienionych komórek z neutrofilami); Uczestniczy w morfogenezie kości i różnicowaniu chondrocytów

Białko 1 dla receptora LDL	LRP1	Białko błonowe	Białko zaangażowane w endocytozę i fagocytozę komórek apoptotycznych oraz homeostazę lipidów błonowych
Białko 14-3-3: Beta Epsilon Gamma Teta Zeta	 YWHAB YWHAE YWHAG YWHAQ YWHAZ	Cytoplazma	Białka adaptorowe biorące udział w transmisji sygnałów; Wiążące się z różnymi białkami poprzez reszty fosfoseryny lub fosfotreoniny
Białko 18 towarzyszące spermatogenezie	SPATA18	Cytoplazma Zewnętrzna błona mitochondrialna	Uczestniczy w naprawie/degradacji wadliwych mitochondriów
Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego	VDAC2	Zewnętrzna błona mitochondrialna	Formuje kanał w wewnętrznej błonie mitochondrialnej dla małych hydrofilowych molekuł; W formie otwartej – przepuszcza aniony, w zamkniętej – kationy; Wiąże ceramidy sfingolipidów, fosfatydylocholinę i reszty cholesterolu
Białko 20 towarzyszące witce	CFAP20	Jądro komórkowe Cytoplazma Cytoszkielet	Białko specyficzne dla witki, uczestniczące w ruchliwości komórki; Niezbędne do poliglutamylacji mikrotubul
Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną	RPS27A	Cytoplazma	Posiada domenę wiążącą ubikwitynę; Może być zaangażowane w naprawę DNA, degradację retikulum endoplazmatycznego, endocytozę oraz aktywację swoistych kinaz białkowych
Białko 2 zewnętrznego włókna osiowego plemnika	ODF2	Cytoplazma Cytoszkielet Centrosomy	Główny składnik włókien osiowych plemnika; uczestniczy w ruchliwości plemnika
Białko 4B ciałka wielopęcherzykowego	CHMP4B	Cytoplazma	Rdzeń kompleksu III zaangażowanego w proces endosomalnego sortowania tj. powstawania oraz wykształcania ciałek wielopęcherzykowych (MVBs); Uczestniczy w transporcie i znakowaniu białek ubikwityną
Białko 4 wiążące retinol	RBP4	Wydzielane zewnątrzkomórkowo	Uczestniczy w transporcie retinolu w plazmie (z wątroby do tkanek peryferyjnych)
Białko 50A kontrolujące cykl komórkowy	TMEM30A	Błona plazmatyczna Aparat Golgiego	Podjednostka ATPazy translokującej fosfolipidy z jednej strony powierzchni błony plazmatycznej na drugą; Odpowiada za utrzymane asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów po obu stronach błony
Białko chaperonowe 70 (forma mitochondrialna)	HSPA9	Mitochondrium	Bierze udział w powstawaniu centrów żelazowo-siarkowych (ISC), najprawdopodobniej bierze udział w proliferacji i „starzeniu się” komórek

Białko NEL	NEL	Cytoplazma Wydzielane zewnątrzkomórkowo	Wiąże jony Ca^{2+}, heparynę i kinazę C białek; Bierze udział w proliferacji komórek; Uczestniczy w procesie zapłodnienia
Białko podobne do alfa-1 kwaśnej glikoproteiny 2	ORM2	Wydzielane zewnątrzkomórkowo	Działa jako białko transportowe w krwioobiegu; Wiąże różne hydrofobowe ligandy we wnętrzu swojej domeny
Białko RAP1B z rodziny Ras	RAP1B	Błona plazmatyczna Cytoplazma	Wykazuje aktywność GTPazową; Może brać udział w formowaniu bariery endotelialnej
Białko RAB10 z podrodziny Ras	RAB10	Błona plazmatyczna Aparat Golgiego Błona aparatu Golgiego Błona endosomowa Błona retikulum endoplazmatycznego	Białko transportowe
Białko RAB2A z podrodziny Ras	RAB2A	Błona aparatu Golgiego Błona mitochondrium Błona retikulum endoplazmatycznego	Posiada aktywność GTPazy
Białko RAB5B z podrodziny Ras	RAB5B	Błona plazmatyczna Błona endosomowa	Białko transportowe
Białko Ran wiążące GTP	RAN	Jądro komórkowe Cytoplazma	Posiada aktywność GTPazy; Uczestniczy w transporcie komórkowym
Białko RhoC wiążące GTP	RHOC	Błona plazmatyczna	Uczestniczy w transdukcji sygnałów
Białko SPARC	SPARC	Wydzielane zewnątrzkomórkowo, Błona podstawna	Wpływa na wzrost komórek poprzez interakcje z komponentami matriks zewnątrzkomórkowego i cytokinami; Wiąże m.in. jony wapnia, miedzi, kilka typów kolagenu, albuminę, trombospondynę i PDGF; Wiąże się z powierzchnią błony plazmatycznej
Białko szoku termicznego 70 kDa	HSP70	Cytoplazma Jądro komórkowe Perikarion Błona plazmatyczna	Chaperon molekularny chroniący proteom przed stresem; Zaangażowany w fałdowanie i transport nowo zsyntetyzowanych białek
Białko szoku termicznego 71 kDa	HSPA8	Cytoplazma	Zaangażowane w ochronę proteomu przed stresem, fałdowanie i transport białek, formowanie i dysocjację kompleksów białkowych oraz apoptozę komórek
Białko szoku termicznego 90 kDa – alfa Białko szoku termicznego 90 kDa – beta	HSP90AA1 HSP90AB1	Cytoplazma Melanosomy	Chaperon molekularny inicjujący dojrzewanie, ustalenie struktury oraz właściwej regulacji białek odpowiedzialnych za cykl komórkowy i transmisję sygnałów

Białko wiążące kwasy tłuszczowe	FABP7	Cytoplazma	Białko uczestniczące w wewnątrzkomórkowym transporcie kwasów tłuszczowych
Białko wiążące osłonę przejrzystą 1	ZPBP1	Akrosom Błona akrosomu	Spermatogeneza, fuzja plemnika z oocytem
Białko z rodziny 2 rozpuszczalnych transporterów, ułatwiające transport glukozy	SLC2A3	Błona plazmatyczna	Odpowiedzialne za transport wybranych monosacharydów tj. glukozy, 2-deoksyglukozy, mannozy, ksylozy, fukozy oraz najprawdopodobniej – dehydroaskorbinianu przez błonę plazmatyczną
Białko z rodziny polipeptydów posiadających domenę EF	EFHC2	Cytoplazma Cytoszkielet	Białko wchodzące w skład mikrotubul, składowa dyneiny
Chaperon BIP z retikulum endoplazmatycznego	HSPA5	Cytoplazma Retikulum endoplazmatyczne Melanosomy	Bierze udział w „fałdowaniu” oraz degradacji białek, proliferacji i apoptozie komórek
Cytoplazmatyczna hydrataza akonitanowa (akonitaza)	ACO1	Cytoplazma	Zawiaduje biodostępnością jonów żelazowych; Wpływa na ekspresję genów odpowiedzialnych za absorbcję, sekwestrację oraz utylizację wyżej wymienionych jonów; Może wpływać na zahamowanie translacji ferrytyny oraz syntazy ALA jednocześnie stabilizując mRNA receptora transferyny
Czynnik 5 ADP-rybozylacji	ARF5	Aparat Golgiego	Posiada aktywność GTPazy; Uczestniczy w transporcie komórkowym
Czynnik elongacyjny alfa-1	EEF1A	Cytoplazma	Wykazuje aktywność GTPazy; Bierze udział w procesie biosyntezy białek; Wiąże kinazy białek, tRNA i RNA
Czynnik elongacyjny II	EEF2	Cytoplazma	Katalizuje GTP-zależną translokację rybosomalną podczas elongacji translacji
Czynnik NHE-RF1 regulujący wymianę jonów Na^+/H^+	NHERF1	Błona plazmatyczna	Należy do rodziny ezryn/moezyn/ radyksyn; Zaangażowane w reabsorpcję reszt fosforanowych, kapacytację i utrzymanie homeostazy jonów chlorkowych/wodorowęglanu w plemnikach
Cytochrom C	CYC	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Białko przenoszące elektrony w łańcuchu oddechowym; Uczestniczy w powstawaniu ATP; Uczestniczy w apoptozie
Deglikaza DJ-1 białek/kwasów nukleinowych	PARK7	Błona plazmatyczna Cytoplazma Jądro komórkowe Mitochondrium Retikulum endoplazmatyczne	Deglikuje reszty cysteiny, argininy i lizyny w białkach, jednocześnie ponownie aktywując je poprzez odwrócenie glikacji przeprowadzanych przez glioksale

Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego	GAPDH	Cytoplazma Cytoszkielet Jądro komórkowe	Wykazuje aktywność dehydrogenazową i nitrozylazową; Enzym ciągu glikolizy; Bierze udział w transkrypcji, transporcie RNA, replikacji DNA i apoptozie; Przeprowadza S-nitrozylację reszt cysteinowych; Bierze udział w organizacji cytoszkieletu; Wpływa na biosyntezę czynnika TNF oraz interferonu typu I
Dehydrogenaza bursztynianowa	SDHA	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Zaangażowana w mitochondrialny łańcuch oddechowy
Dehydrogenaza jabłczanowa (forma cytoplazmatyczna)	MDH1	Cytoplazma	Bierze udział w ciągu glukoneogenezy oraz cyklu Krebsa
Dehydrogenaza mleczanowa (łańcuch A)	LDHA	Cytoplazma	Uczestniczy w odwracalnym przekształcaniu kwasu mlekowego w pirogronowy;
Dehydrogenaza mleczanowa (łańcuch B)	LDHB	Cytoplazma	Uczestniczy w odwracalnym przekształcaniu kwasu mlekowego w pirogronowy; Wiąże NAD i kinazy
Fibronektyna	FN1	Wydzielana zewnątrzkomórkowo	Wiąże się na powierzchni komórek z różnymi komponentami komórkowymi m.in. kolagenem, fibryną, heparyną, DNA i aktyną; Jest zaangażowana w adhezję i ruchliwość komórek, procesy opsonizacji i bliznowacenia ran oraz utrzymania kształtu komórek; Uczestniczy w regulacji poziomu kolagenu I
Fosfataza gamma białek tyrozynowych typu receptorowego	PTPRG	Białko błonowe	Aktywność fosfatazy tyrozynowej
Fosfataza eta białek tyrozynowych typu receptorowego	PTPRJ	Białko błonowe	Wykazuje aktywność fosfatazy tyrozynowej
Fosfolipaza C zeta-1	PLCZ1	Jądro komórkowe Cytoplazma	Katalizuje hydrolizę PIP2 z wytworzeniem wtórnych przekaźników tj.: 1,2-diacylogicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP3); Odgrywa role w procesie zapłodnienia i embriogenezy kręgowców; Jest białkiem kandydatem podejrzewanym o udział w „rozpuszczaniu" osłony przejrzystej przekazywanym z plemnika do cytoplazmy oocytu podczas procesu fuzji gamet
Gamma- glutamylotransferaza 2 białko-glutamina	TGM2	Błona plazmatyczna Cytoplazma Jadro komórkowe Mitochondrium	Acylotransferaza zależna od jonów wapnia zaangażowana w tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy glutaminą a aminami pierwszorzędowymi; Bierze udział w angiogenezie, rozwoju kości, różnicowaniu komórek, leczeniu ran, modyfikacji chromatyny i apoptozie;

			Wydzielana zewnątrzkomórkowo bierze udział w tworzeniu sieci pomiędzy białkami sekrecyjnymi
Gelsolina	GSN	Wydzielana zewnątrzkomórkowo Cytoplazma Cytoszkielet	Zależna od jonów wapnia; Wpływa na strukturę filamentów aktynowych; Bierze udział w ciliogenezie
GTPaza HRAS	HRAS	Błona plazmatyczna Aparat Golgiego	Posiada aktywność GTPazową
GTPaza NRAS	NRAS	Błona plazmatyczna Aparat Golgiego	Posiada aktywność GTPazową
Homolog białka 42 odpowiadającego za (kontrolujący) podziały komórkowe	CDC42	Błona plazmatyczna	Posiada aktywność GTPazową; Związany z błoną plazmatyczną; Reguluje migrację komórek; Wiąże kinazy białek i tioesterazy;
Inhibitor 2 metaloproteinaz	TIMP2	Wydzielane zewnątrzkomórkowo	Tworzy kompleksy z metaloproteinazami inaktywując je
Izomeraza triozofosforanowa	TPI1	Cytoplazma	Enzym cyklu glikolizy oraz glukoneogenezy, metabolizm węglowodanów
Kalmodulina	CALM CCM1	Źródłem białka są złożone kompleksy białkowe	Uczestniczy w transmisji sygnałów komórkowych; Stymuluje wybrane kinazy białkowe i fosfatazy
Katepsyna D	CTSD	Lizosom	Kwaśna proteaza, enzym kluczowy w procesie formowania żółtka; Uczestniczy w proteolizie oraz procesie apoptozy białek
Kinaza białek tyrozynowych typu protoonkogenowego	ROS1	Błona plazmatyczna	Bierze udział w różnicowaniu, proliferacji, wzroście oraz przeżywalności komórek
Kinaza difosforanów nukleozydów	NDK	Cytoplazma Błona cytoplazmatyczna	Uczestniczy w syntezie trifosforanów nukleozydów; Zaangażowana w proliferację, Różnicowanie i wzrost komórek, transdukcję sygnałów, endocytozę i ekspresję genów
Kinaza fosfoglicerynianowa	PGK	Cytoplazma	Enzym cyklu glikolitycznego
Kinaza kreatynowa podtyp B	CKB	Cytoplazma	Katalizuje odwracalny transfer reszty fosforanowej z ATP na wybrane fosfogeny; Pełni kluczową rolę w transdukcji sygnałów w plemnikach
Kinaza kreatynowa podtyp M	CKM	Cytoplazma	Katalizuje odwracalny transfer reszty fosforanowej z ATP na wybrane fosfogeny; Pełni kluczową rolę w transdukcji sygnałów w plemnikach
Kinaza kreatynowa podtyp S (forma mitochondrialna)	CKMT2	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Pełni kluczową rolę w transdukcji sygnałów w plemnikach
Kinaza pirogronianowa	PKM	Cytoplazma	Enzym ciągu glikolizy

Kinaza UMP/CMP	CMPK	Cytoplazma Jądro komórkowe	Biosynteza nukleotydów pirymidynowych, aktywność fosfatazy difosforanów nukleozydów
Klusteryna	CLU	Wydzielana zewnątrzkomórkowo Cytoplazma Jądro komórkowe Mitochondrium Retikulum endoplazmatyczne	Zewnątrzkomórkowy chaperon; Hamuje agregację nienatywnych białek wywołaną stresem; Nie wymaga do działania nakładu ATP; Utrzymuje struktury białek w stanie częściowo niezwiniętym; Jej związanie z receptorami powierzchniowymi błony plazmatycznej inicjuje proces degradacji lizosomalnej i proteosomalnej; Gdy jest wydzielana zewnątrzkomórkowo to chroni komórki przed apoptozą oraz cytolizą jej poszczególnych składowych; Współdziałając z ubikwityną i białkiem SCF uczestniczy w degradacji białek; Bierze udział w różnicowaniu komórek i stabilizacji białek
Kofaktor NHE-RF1 regulujący wymianę jonów Na^+/H^+	SLC9A3R1	System błon wewnątrzkomórkowych	Białko podporowe łączące białka błony plazmatycznej z białkami z rodziny ezryn, moezyn i radyksyn (rodzina ERM)
Lizozym G	LYG	Wydzielane zewnątrzkomórkowo	Wykazuje aktywność glukanohydrolazową; Działa preferencyjnie w stosunku do reszt kwasu N-acetylomuraminowego; Może wykazywać działanie antybakteryjne
Łańcuch 1(XII) kolagenu alfa-1	COL12A1	Wydzielany zewnątrzkomórkowo	Kolagen typu XII wchodzi w interakcję z kolagenem typu I; Bierze udział w adhezji komórek, organizacji fibryli kolagenowych oraz różnicowaniu komórek endodermalnych
Łańcuch alfa tubuliny	TBA1 TBA2 TBA4 TBA5 TBA8	Cytoplazma Cytoszkielet	Składowa mikrotubul uczestniczących w ruchu plemników
Łańcuch beta tubuliny	TBB1 TBB2 TBB3 TBB4 TBB5 TBB6 TBB7	Cytoplazma Cytoszkielet	Składowa mikrotubul uczestniczących w ruchu plemników
Łańcuch ciężki ferrytyny	FTH	Cytoplazma	Magazynuje jony żelaza w nietoksycznej i łatwo dostępnej formie; Wykazuje aktywność ferroksydazową; Dostarcza żelazo do komórek

Łańcuch C immunoglobuliny lambda	LAC	Wydzielany zewnątrzkomórkowo	Komponent matrix zewnątrzkomórkowego; Wiąże się z powierzchnią błony plazmatycznej; Posiada domeny wiążące antygeny i immunoglobuliny; Bierze udział w fagocytozie;
Łańcuch lekki immunoglobuliny ze stałym regionem	IGLC3	Wydzielany zewnątrzkomórkowo Błona plazmatyczna	Komponent matrix zewnątrzkomórkowego; Wiąże się z powierzchnią błony plazmatycznej; Posiada domeny wiążące antygeny i immunoglobuliny;
Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn	ASTL	Cytoplazma Błona plazmatyczna	Specyficzny receptor zlokalizowany na oolemie biorący udział w fuzji oocytu i plemnika oraz procesie zapłodnienia; Zapobiega polispermii; wykazuje aktywność proteazową w kierunku ZP2
Miozyna-9	MYH9	Cytoplazma Cytoszkielet	Bierze udział w cytokinezie, formowaniu komórek, sekrecji oraz „czapeczkowaniu” białek
Mitochondrialny antyport H^+/Ca^{2+}	LETM1	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Mitochondrialne białko pełniące rolę antyportu dla jonów H^+/Ca^{2+}
Mutaza fosfoglicerynianowa 1	PGAM1	Cytoplazma	Enzym ciągu glikolizy; Wykazuje aktywność hydrolazową; Wiąże kinazy białek
Neuronalny czynnik regulujący NEGR1 (Neurotraktyna)	NEGR1	Błona plazmatyczna	Zaangażowane w adhezję komórek; Należy do nadrodziny immunoglobulin
Oksydaza sulfhydrylowa 1	QSOX1	Wydzielana zewnątrzkomórkowo, Aparat Golgiego	Właściwości bakteriobójcze; Katalizuje oksydację grup sulfydrylowych w białkach i peptydach; Bierze udział w tworzeniu wiązań disiarczkowych w wielu białkach wydzielanych zewnątrzkomórkowo; W niektórych tkankach niezbędna do właściwej adhezji i migracji komórek
Owotransferyna	TRFE	Wydzielana zewnątrzkomórkowo	Odpowiedzialna za transport żelaza z miejsc absorpcji i degradacji hemu do miejsc magazynowania/rozkładania jonów; Bierze udział w proliferacji komórek; wykazuje działanie bakteriostatyczne
Peptydylo-prolyl cis/trans izomeraza B	PPIB	Retikulum endoplazmatyczne Melanosomy	Bierze udział w fałdowaniu białek poprzez izomeryzację cis/trans wiązań wytworzonych przez reszty proliny
Peroksyredoksyna-1	PRDX1	Cytoplazma	Wykazuje wysoką specyficzność do tioli; Reguluje poziom wewnątrzkomórkowego poziomu H_2O_2; Neutralizuje nadtlenki
Peroksyredoksyna-6	PRDX6	Cytoplazma Lizosom	Wykazuje wysoką specyficzność do tioli; Reguluje poziom wewnątrzkomórkowego poziomu H_2O_2; Neutralizuje nadtlenki;

			Reguluje poziom fosfolipidów w komórce
Podjednostka alfa-1 białka czapeczkującego F-aktynę	CAPZA1	Cytoplazma Miofibryle	Białko czapeczkujące filamenty aktynowe zależne od jonów Ca^{2+}; Najprawdopodobniej bierze udział w formowaniu połączeń między komórkami epitelialnymi;
Podjednostka alfa-2 acetylohydrolazy IB czynnika aktywującego płytki (PAF)	PAFAH1B2	Cytoplazma	Katalizuje hydrolizę reszt acetylowych w pozycji sn-2 PAFu oraz jego analogów; Najprawdopodobniej bierze udział w podziałach mejotycznych męskich komórek rozrodczych oraz wstępnym etapie spermatogenezy
Podjednostka alfa-2 białka czapeczkującego F-aktynę	CAPZA2	Cytoplazma Miofibryle	Białko czapeczkujące filamenty aktynowe zależne od jonów Ca^{2+}
Podjednostka β-5 proteasomu (fragment)	PSMB5	Cytoplazma Jadro komórkowe	Komponent proteasomu 20s zaangażowanego w ATP-zależną degradację białek z dołączoną ubikwityną;
Podjednostka beta syntazy ATP (forma mitochondrialna)	ATP5F1B	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Bierze udział w syntezie ATP
Podjednostka eta białka 1 T-kompleksu	CCT7	Cytoplazma	Komponent T-kompleksu działającego jak chaperon molekularny wspomagający proces fałdowania białek pod wpływem hydrolizy ATP
Podjednostka flawoproteinowa A dehydrogenazy bursztynianowej	SDHA	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Zaangażowana w mitochondrialny łańcuch oddechowy
Podjednostka katalityczna beta fosfatazy PP1 serynowo-treoninowej białek	PPP1CB	Cytoplazma Jądro komórkowe	Enzym zaangażowany w podział komórek i syntezę białek
Podjednostka Rieske kompleksu cytochromu b-c1 (forma mitochondrialna)	UQCRFS1	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Zaangażowana w mitochondrialny łańcuch oddechowy
Podjednostka teta białka 1 T-kompleksu	CCT8	Cytoplazma Cytoszkielet Centrosomy	Komponent T-kompleksu zawierającego chaperoninę; Chaperon molekularny uczestniczący w prawidłowym fałdowaniu białek podczas hydrolizy ATP; Bierze udział w prawidłowym fałdowaniu aktyny i tubuliny oraz usuwaniu toksyn
Podjednostka zeta białka 1 T-kompleksu	CCT6	Cytoplazma	Białko chaperonowe, bierze udział w fałdowaniu się aktyny i tubuliny
Podjednostka żelazowo-siarkowa dehydrogenazy bursztynianowej (forma mitochondrialna)	SDHB	Wewnętrzna błona mitochondrialna	Zaangażowana w mitochondrialny łańcuch oddechowy
Podobny do SSC5D rozpuszczalny receptor nekrofagotyczny zawierający domenę bogatą w cysteinę	SSC5D	Cytoplazma Wydzielany zewnątrzkomórkowo	Wykazuje działanie bakteriostatyczne; Może odgrywać rolę obronną i homeostatyczną niektórych powierzchni nabłonka
Poliubikwityna B	UBB	Cytoplazma Jądro komórkowe Mitochondria	Zaangażowana w naprawę DNA, degradację retikulum endoplazmatycznego, odpowiedź na stres typu proteotoksycznego, endocytozę oraz aktywację swoistych kinaz białkowych

Proteaza cysteinowa ATG4B	ATG4B	Cytoplazma, Retikulum endoplazmatyczne, Mitochondrium	Wykazuje aktywność proteazową i działanie delipidacyjne w kierunku białek z rodziny ATG8 zaangażowanych w przyłączanie reszt fosfatydyloetan oloaminy do błony plazmatycznej
Radyksyna	RDX	Błona plazmatyczna Cytoszkielet	Najprawdopodobniej łączy końce filamentów aktynowych z błoną plazmatyczną
Receptor 1 transferyny	TFRC	Błona plazmatyczna, Melanosomy	Niezbędny do rozwoju erytrocytów; Działa jak sensor poziomu lipidów; Przy wysokim stężeniu stearynianu degraduję mitofuzynę i hamuje fuzję mitochondriów, przy niskim - odwrotnie
Receptor sprzężony z białkiem G	FZD7	Błona plazmatyczna Błona endosomowa	Receptor w szlaku sygnalizacyjnym WNT
S-transferaza glutationowa	GST	Wydzielana zewnątrzkomórkowo	Bierze udział w powstawaniu glutationu, biogenezie hormonów steroidowych
Syntaza kwasów tłuszczowych	FASN	Cytoplazma	Katalizuje syntezę długołańcuchowych kwasów tłuszczowych *de novo*
Transtyretyna	TTR	Wydzielana zewnątrzkomórkowo	Białko wiążące hormony tarczycy; Najprawdopodobniej wiąże tyroksynę i transportuje ją do mózgu; Około 40% transtyretyny w plazmie występuje w ścisłym kompleksie z białkiem wiążącym retinol (RBP)

4.11. Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych fosfoprotein

Dzięki zastosowaniu programu ShinyGo 0.77 (ustawienia: gatunek –*Gallus gallus*, baza danych – GO Biological Process) wykazano, że fosfoproteiny plazmy nasienia indora biorą udział w zapłodnieniu komórki jajowej, organizacji cytoszkieletu aktynowego, jego metabolizmie, wzmacnianiu sygnału transportu wewnątrzkomórkowego, ogólnej regulacji transportu, transporcie pęcherzykowym, ustalaniu składów proteomów poszczególnych przedziałów komórkowych, regulacji organizacji i lokalizacji wybranych komponentów komórkowych oraz lokalizacji makrocząsteczek **(Rycina 4.49)**. Z kolei fosfoproteiny obecne w plemnikach odgrywają kluczowe role w generowaniu zasobów energetycznych w komórce, procesach metabolicznych związanych z przemianami glukozy i pirogronianu, interakcji i wiązaniu się z plemnika z komórką jajową, zapłodnieniu, procesach metabolicznych obejmujących nukleozydy, nukleotydy oraz związki niskocząsteczkowe **(Rycina 4.50)**.

W wyniku przeprowadzeniu analiz interakcji białko-białko otrzymano dwie główne sieci połączeń proteomicznych występujące w plazmie nasienia (**Rycina 4.51**) i plemnikach indora (**Rycina 4.63**). Omawiane sieci podzielone zostały na grupy (klastery) zgodnie z prawdopodobieństwem wystąpienia interakcji pomiędzy białkami wchodzącymi w skład danego klastera. W plazmie wyróżniono 11, natomiast w plemnikach 9 takich grup.

W plazmie nasienia indora grupa pierwsza obejmowała białka kodowane przez następujące geny: ALB, APOA1, CA2, CLU, CTSD, FTH1, GOT1, ORM2, RBP4, SPARC, TF, TFRC, TTR. Najwięcej znaczących interakcji (> 0,7) zaobserwowano w przypadku albuminy (ALB), która jest dominującym białkiem plazmy nasienia indora. ALB oddziaływała z APOA1 (0,987), GOT1 (0,742), ORM2 (0,848), RBP4 (0,825), SPARC (0,989), TF (0,836), TFRC (0,801) oraz TTR (0,943). Wskazywać to może na kluczową rolę albuminy w transporcie wybranych związków wielkocząsteczkowych i jonów w nasieniu oraz uczestniczeniu w metabolizmie lipidów plemników indorów. W przypadku apolipoproteiny 1 (APOA1) interakcje obejmowały głównie odziaływania z CLU (0,995), ORM2 (0,830), RBP4 (0,788), TF (0,976) oraz TTR (0,975). Odziaływania występowały głównie pomiędzy białkami występującymi najobficiej w plazmie nasienia oraz białkami regulującymi gospodarkę lipidową oraz żelazową w nasieniu. Ponadto na uwagę zasługują bardzo silne interakcje pomiędzy białkami odpowiadającymi za gospodarkę jonami żelaza w nasieniu to jest pomiędzy FTH1 a TFRC (0,989) oraz TF a TFRC (0,999) (**Rycina 4.52**).

Drugi klaster obejmował białka kodowane przez następujące geny: ACO1, ALDOC, GAPDHS, LDHA, LDHB, MDH1, NEGR1, PGAM1, PGK1, PGK2, PKLR, TPI1. Są to białka zaangażowane w ciąg reakcji glikolitycznych, które w większości wykazywały silne (> 0,7) interakcje pomiędzy sobą. Największą ilość interakcji, o wysokim poziomie ufności, zanotowano pomiędzy izomerazą triozofosforanową (TPI1) a ACO1 (0,708), ALDOC (0,982), GAPDHS (0,997), LDHA (0,893), LDHB (0,848), MDH1 (0,798), PGAM1 (0,975), PGK1 (0,999), PGK2 (0,996), PKLR (0,956). Wskazują one na ścisłe współdziałanie enzymów rozkładających glukozę w celu generowania ATP (**Rycina 4.53**).

Grupa trzecia obejmowała białka kodowane przez następujące geny: IGLL5, PTPRG, PTPRJ, SSC5D. Dwa z białek kodowane przez PTPRG i PTPRJ wykazują aktywność fosfataz. Interakcja, która występowała pomiędzy nimi, charakteryzowała się średnim przedziałem ufności (0,634). PTPRJ defosforyluje wiele cząsteczek sygnałowych oraz bierze udział w adhezji, proliferacji, różnicowaniu i migracji komórek, natomiast PTPRG zawiera domenę dla fibronektyny. W tej grupie nie zaobserwowano znaczących oddziaływań pomiędzy analizowanymi białkami (**Rycina 4.54**).

Klaster czwarty zawierał białka kodowane przez następujące geny: ACR, ASTL, ATP13A4, PAFAH1B2, PLCZ1, ZPBP. Były to białka biorące udział w aktywacji oocytu oraz procesie zapłodnienia oocytu przez plemnik. Pomiędzy omawianymi białkami, występowały jedynie interakcje na poziomie średnim (przedział 0,426-0,575) (**Rycina 4.55**).

Grupa piąta składała się z białek kodowanych przez następujące geny: ARF5, ATG4B, RAB2A, RAB5B, RAP1B. Są to białka wiążące GTP, prezentujące aktywność GTPazową i biorące udział w szlaku endosomalnym. W przypadku tej grupy wykazano pojedynczą silną interakcję pomiędzy białkami RAP1B z rodziny Ras oraz RAB5B z podrodziny Ras (0,793). Może to wskazywać na wzajemne powiązanie ich funkcji regulatorowych (**Rycina 4.56**).

Szósty klaster obejmował białka kodowane przez następujące geny: CKB, CKM, CMPK1, GLG1, NME4, QSOX1. Są to polipeptydy wykazujące między innymi aktywność kinaz, biorące udział w biosyntezie kreatyny, fosfokreatyny, rybonukleotydów pirymidynowych i organicznych fosforanów. Na uwagę zasługują trzy bardzo silne interakcje pomiędzy CKB a CKM (0,974), NME4 a CMPK1 (0,967) oraz NME4 a CKB (0,789). Kinaza kreatynowa typu B (CKB) jest kluczowym enzymem zarządzającym transdukcją energii w plemnikach, więc jej interakcja z kinazą difosforanów nukleozydów

(NME4) może pozwalać na zachowanie zasobów i obiegu energii w gametach. Z kolei oddziaływanie NME4 z kinazą UMP-CMP (CMPK1) może wskazywać na udział tej ostatniej w odnawianiu zasobu wysokoenergetycznych nukleotydów. Dwa z białek to jest oksydaza sulfhydrylowa 1 (QSOX1) oraz białko 1 aparatu Golgiego (GLG1) nie oddziaływały z pozostałymi białkami znajdującymi się w tej grupie ani w ogóle w całej sieci proteomicznej plazm nasienia (**Rycina 4.57**).

Grupa siódma obejmowała białka kodowane przez następujące geny: CALM3, CHMP4B, TUBA1A, TUBA1B, TUBA3C, TUBA8, TUBB2A, TUBB2B. Wymienione białka biorą udział w organizacji cytoszkieletu oraz mitozie komórek. Białko 4B ciałka wielopęcherzykowego (CHMP4B, endosom) bardzo silnie (≥ 0,9) oddziaływało z wybranymi tubulinami tj. TUBA1A (0,901), TUBA1B (0,904), TUBA8 (0,900), TUBB2A (0,900) oraz TUBB2B (0,900). Może to wskazywać, że dynamika działania endosomu jest oparta na mikrotubulach. Kalmodulina (CALM3) prezentowała interakcje na znacznie niższym poziomie ufności (**Rycina 4.58**).

Grupa ósma obejmowała białka kodowane przez następujące geny: HRAS, NRAS, ROS1, RPS27A, UBB, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ. W zdecydowanej większości są to białka zaangażowane w apoptotyczna ścieżkę sygnałową oraz ograniczające występowanie mutacji w DNA. GTPaza HRAS wykazywała interakcje z największą ilością białek tj. NRAS (0,987), ROS1 (0,841), RPS27A (0,919), UBB (0,925), YWHAB (0,941), YWHAE (0,942), YWHAG (0,940), YWHAQ (0,935) i YWHAZ (0,946) stając się tym samym kluczowym białkiem omawianej grupy, które dzięki swej funkcji regulacyjnej mogło pośrednio wpływać na wystąpienie apoptozy i/lub próbę naprawy DNA w komórce. Jego rola może być wzmacniana przez oddziaływanie z GTPazą NRAS (**Rycina 4.59**).

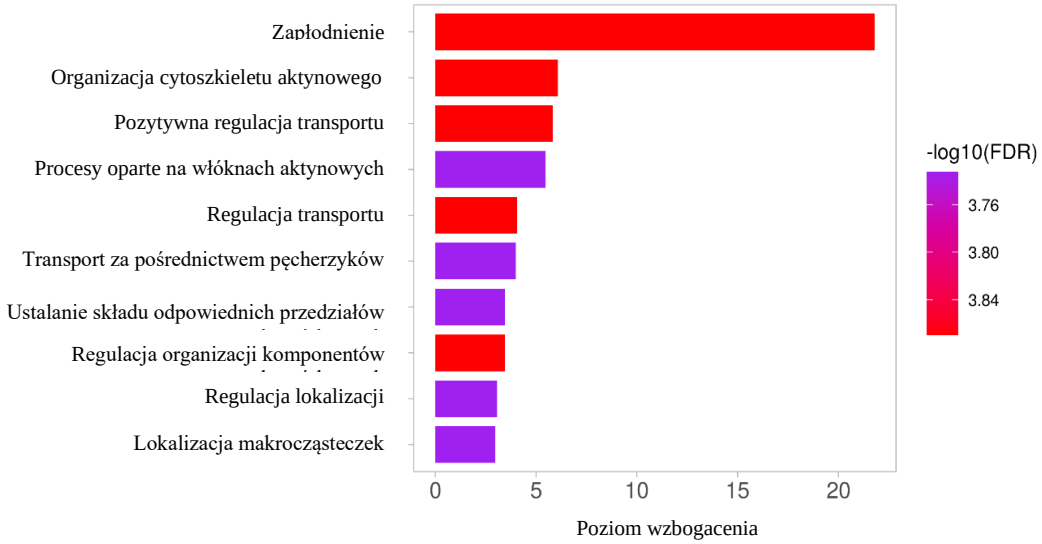
Dziewiąty klaster składał się z białek kodowanych przez następujące geny: ACTA2, ANXA1, CDC42, COL12A1, EEF1A1, FN1, FZD7, GSN, TIMP2, TUBB4A. Wszystkie kodowane białka wykazują silne powinowactwo do anionów. Ponadto mogą uczestniczyć w organizacji cytoszkieletu aktynowego. Najwięcej silnych (> 0,7) oddziaływań zaobserwowano w przypadku fibronektyny (FN), białka występującego w wysokich ilościach w plazmie nasienia indora. Ze względu na ilość domen znajdujących się na jej powierzchni i jej zdolności wiążące dochodzi do występowania interakcji z ACTA2 (0,766), ANXA1 (0,944), CDC42 (0,974), COL12A1 (0,778), EEF1A1 (0,973), FZD7 (0,783), GSN

(0,942), TIMP2 (0,711) i TUBB4A (0,712). W związku z tym ekspresja fibronektyny jest niezbędna do zajścia wybranych procesów komórkowych związanych między innymi z fagocytozą, migracją czy proliferacją komórek **(Rycina 4.60)**.

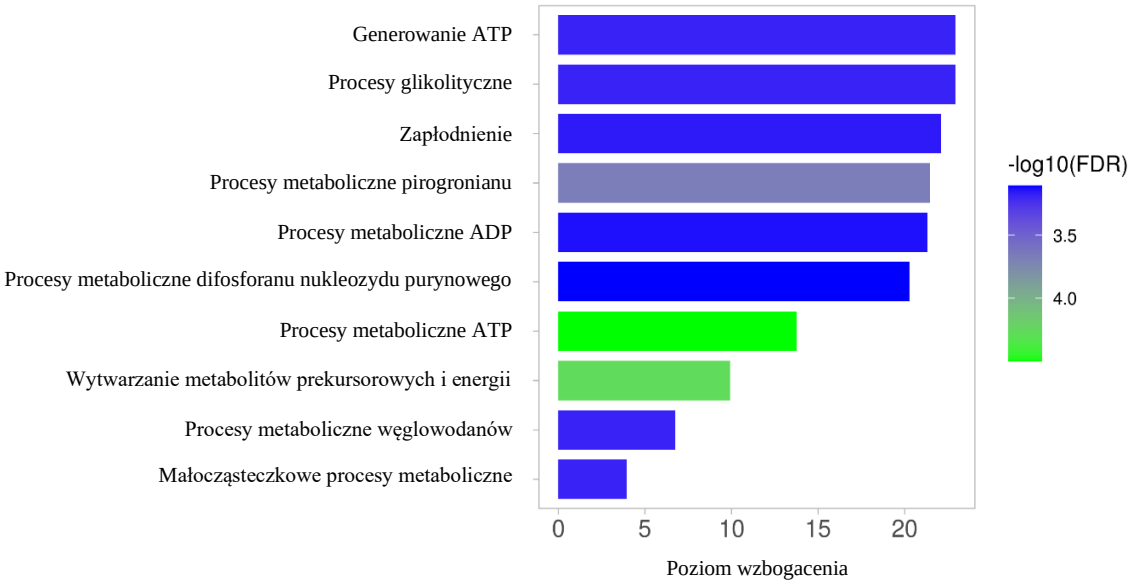
Grupa dziesiąta zawierała białka kodowane przez następujące geny: ACTA1, ACTB, ACTC1, ACTG1, ACTN1, ACTN4, FASN, MYH9, PPIB, RDX, TUBB1, TUBB3, TUBB6. Większość z nich stanowiły białka formujące cytoszkielet komórki tj. aktyny, aktyniny, radyksyny, miozyny oraz tubuliny. Poza tym polipeptydy te mogą wpływać na ruchliwość komórek, ich rozwój, powstawanie połączeń pomiędzy komórkami oraz mogą wpływać na lokalizację innych białek w komórce. Najwięcej interakcji dostrzeżono pomiędzy poszczególnymi rodzajami aktyn, aktynin, aktyn a aktynin, aktyn a radyksyn oraz aktyn a miozyn. Właściwie wszystkie z omawianych interakcji miały bardzo wysoki przedział ufności mieszczący się w zakresie 0,912-0,998. W przypadku syntazy kwasów tłuszczowych (FASN) wykazano tylko jedną średnią interakcję z ACTAB (0,624). Założono, że powyższe białka najprawdopodobniej podlegają koekspresji u innych organizmów. Z kolei interakcje pomiędzy izomerazą B cis-trans peptydylo-prolinową (PPIB) a ACTAB (0,571) oraz ACTG1 (0,452) mogą wskazywać na rolę izomerazy w ostatecznym kształtowaniu elementów wchodzących w skład aparatu ruchu komórek, ze względu na jej zdolność do modulowania procesu fałdowania białek (**Rycina 4.61**).

Grupa jedenasta była najliczniejsza i liczyła aż 24 białka kodowane przez następujące geny: ACTG2, ANXA2, CALM1, CALM2, CAPZA1, CAPZA2, CCT6A, CCT8, EEF2, HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA5, HSPA8, LRP1, PARK7, PRDX1, PRDX6, PSMB5, RAB10, RAN, SLC9A3R1, VDAC2. W tej grupie znalazły się białka, które między innymi modulują aktywność fosfodiesteraz nukleotydów cyklicznych, fosfataz fosfoproteinowych, kalcyneuryny i syntazy tlenku azotu, wpływają na przystosowanie się komórki do występującego stresu cieplnego lub stresu oksydacyjnego, są zaangażowane w tworzenie aglomeratów tubulinowych oraz „czapeczkowanie" końców aktyny, biorą udział w ponownym fałdowaniu białek i ich stabilizacji, autofosforylacji białek, fosforylacji reszt treonylowych w białkach a także wiązaniu plemnika z osłoną przejrzystą oocytu i zapłodnieniu. Najwięcej istotnych oddziaływań (≥ 0,07) zaobserwowano pomiędzy białkami z rodziny HSP a pozostałymi białkami. W największą ilość interakcji wchodziło białko HSP90AA1, które bardzo silnie (≥ 0,09) i silnie (≥ 0,07) oddziaływało z HSPA8 (0,999), HSPA1A (0,999), HSP90AB1 (0,994), HSPA1B (0,991), HSPA5 (0,978), LRP1 (0,969), CAPZA1 (0,917), CAPZA2 (0,910), CALM2 (0,887), PARK7 (0,871), EE2

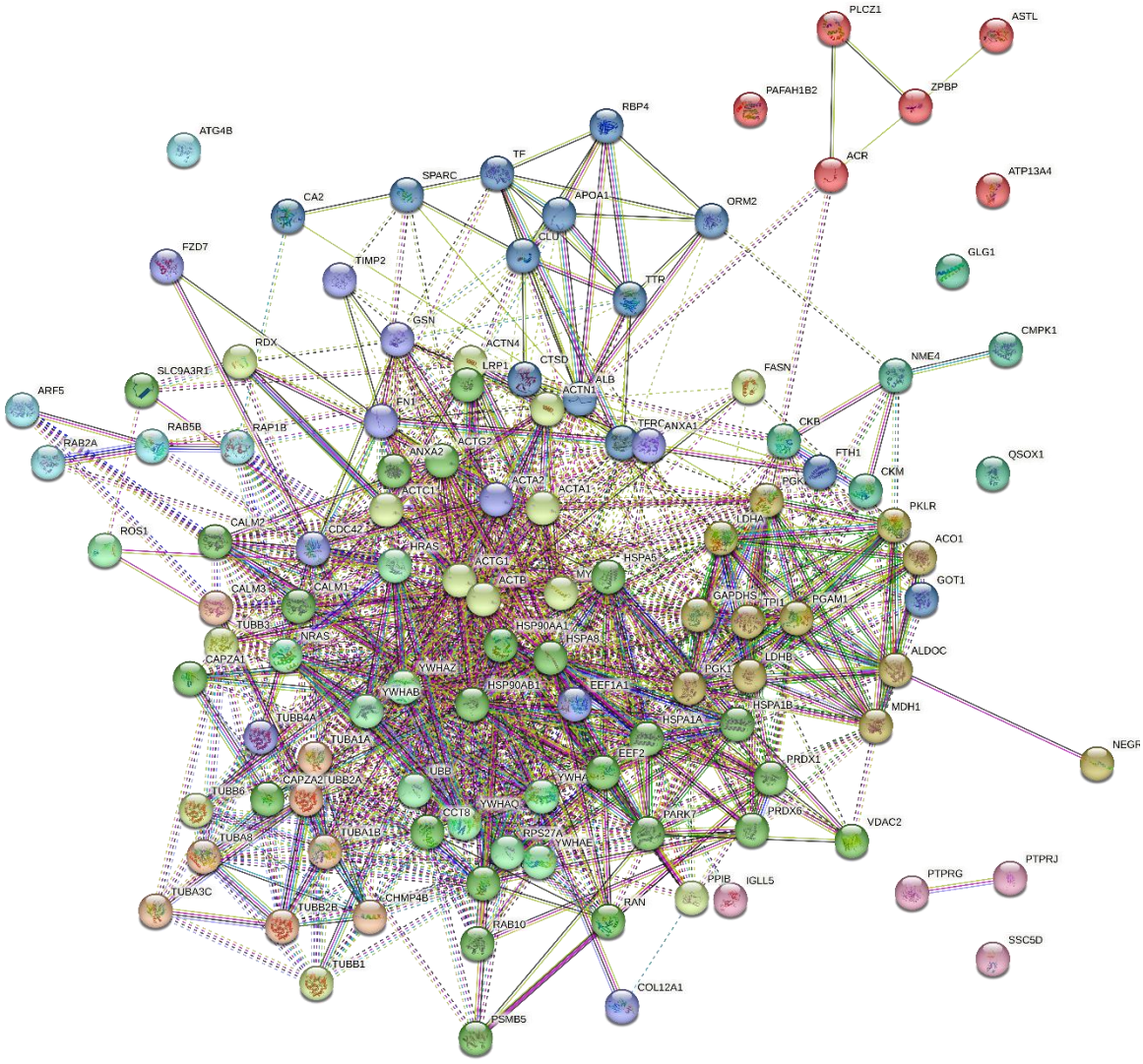
(0,829), CCT8 (0,814), CCT6A (0,758) i CALM1 (0,704). Białka z rodziny HSP mogą pełnić rolę chaperonów wobec pozostałych polipeptydów zebranych w tej grupie i chroniąc je zachowywać ich funkcje regulatorowe, zapewniać nieprzerwaną transdukcję sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz kontrolować cykl komórkowy **(Rycina 4.62)**.



Rycina 4.49 Dziesięć (Top Ten) najważniejszych funkcji zidentyfikowanych fosfoprotein plazm nasienia indorów. Sporządzony na podstawie bazy danych GO Biological Process w ShinyGO 0.77

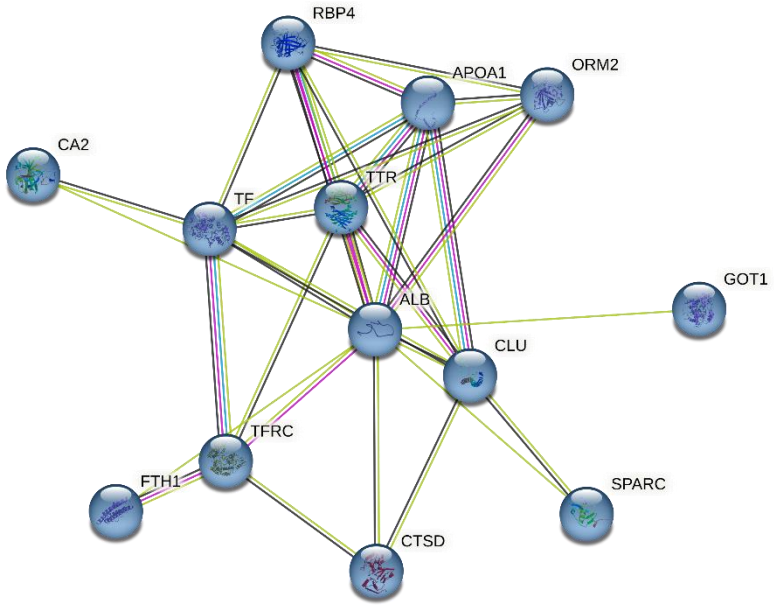


Rycina 4.50 Dziesięć (Top Ten) najważniejszych funkcji zidentyfikowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych indorów. Sporządzony na podstawie bazy danych GO Biological Process w ShinyGO 0.77

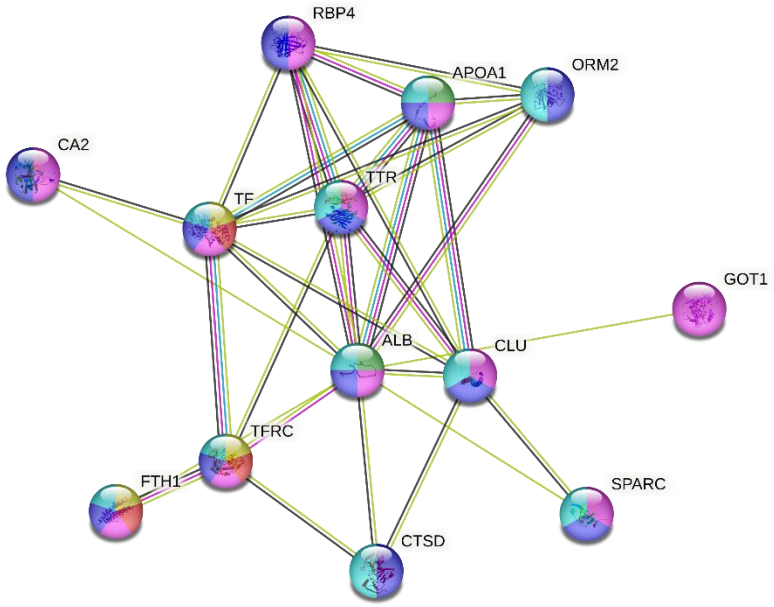


Rycina 4.51 Analiza sieci interakcji białko-białko pomiędzy zidentyfikowanymi fosfoproteinami plazm nasienia indorów przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. Wszystkie białka podzielono na 11 grup funkcyjnych. Linie łączące poszczególne białka to interakcje występujące pomiędzy nimi a kolory linii oznaczają: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, czerwone – prawdopodobne interakcje na podstawie fuzji genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek. Linie przerywane reprezentują interakcje pomiędzy białkami z różnych grup

A



B



Transport jonów żelaza

Transport

Przebudowa cząstek lipoprotein o dużej gęstości

Komórkowa homeostaza jonów żelaza

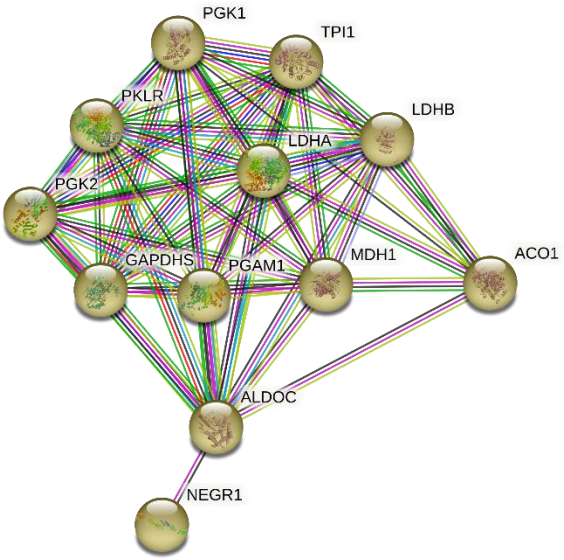
Regulacja jakości biologicznej

Homeostaza chemiczna

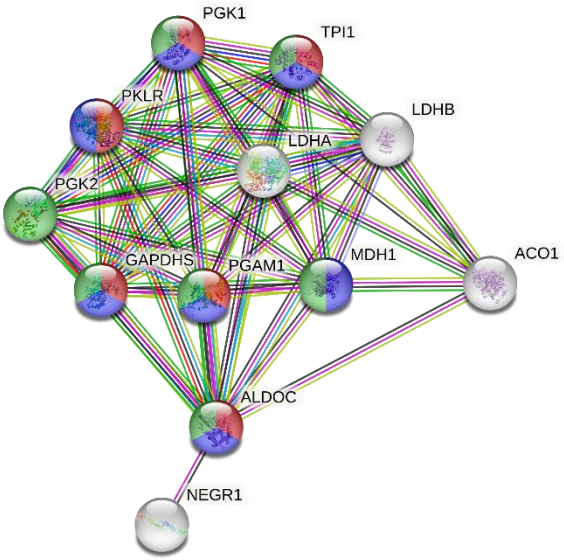
Transport za pośrednictwem pęcherzyków

Rycina 4.52 Grupa 1. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 1. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów

A



B

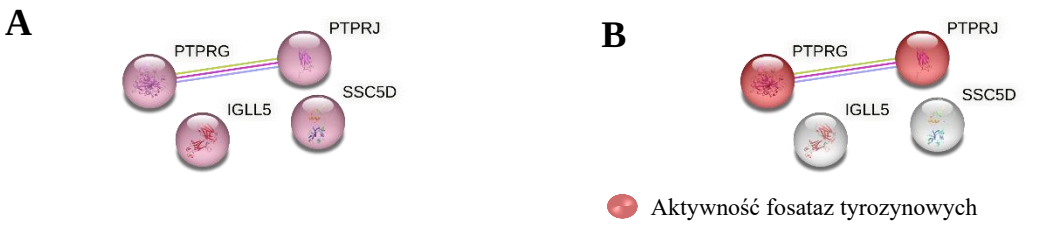


Glikoliza kanoniczna

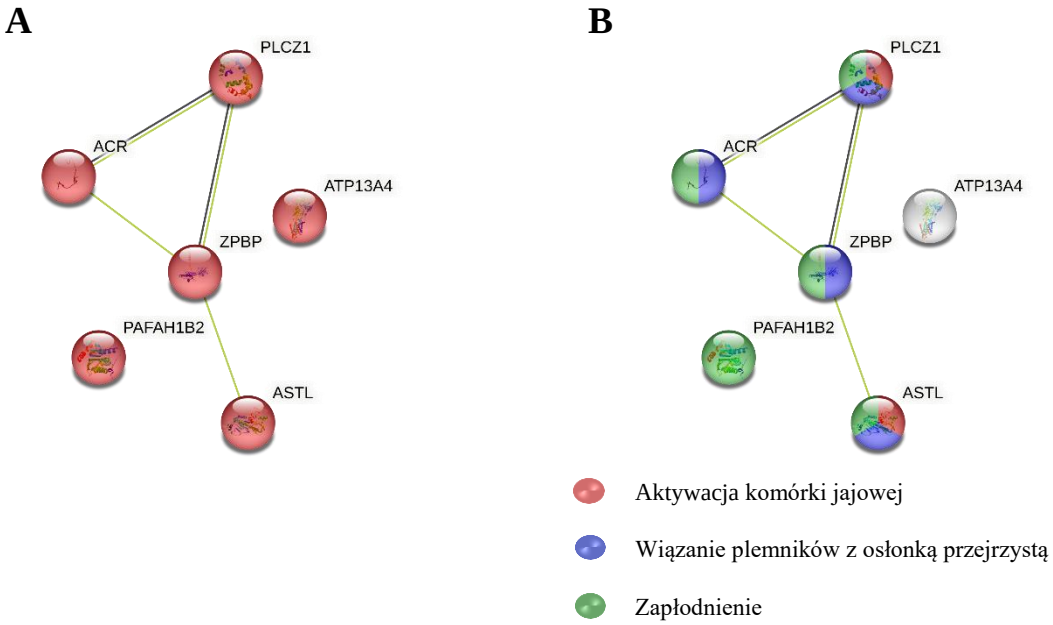
Procesy metaboliczne NAD/NADH

Glukoneogeneza

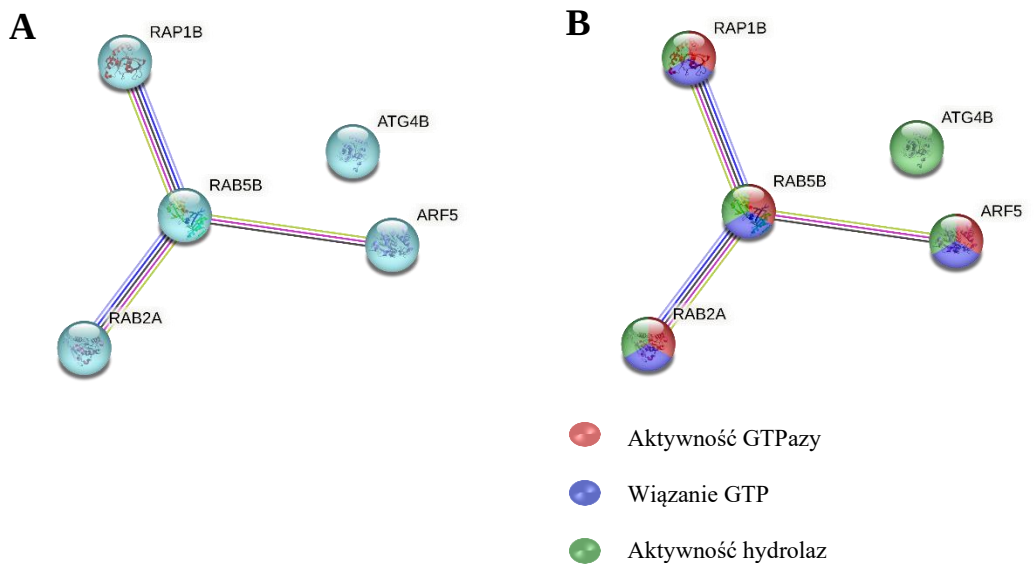
Rycina 4.53 Grupa 2. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 2. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, czerwone – prawdopodobne interakcje na podstawie fuzji genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



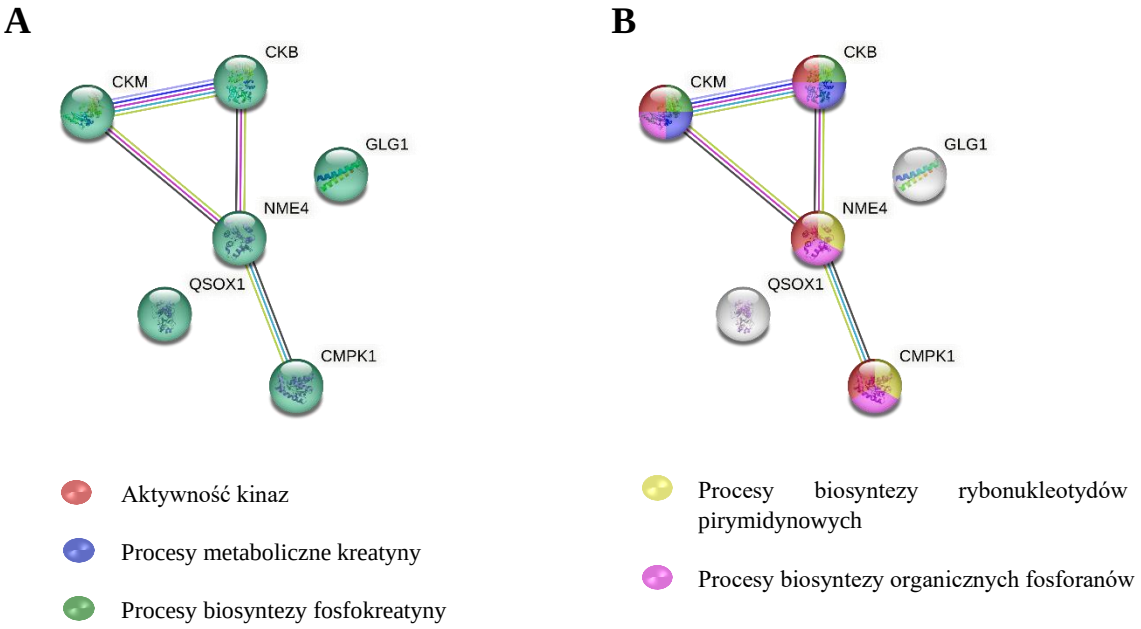
Rycina 4.54 Grupa 3. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 3. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, fioletowy - homologia białek



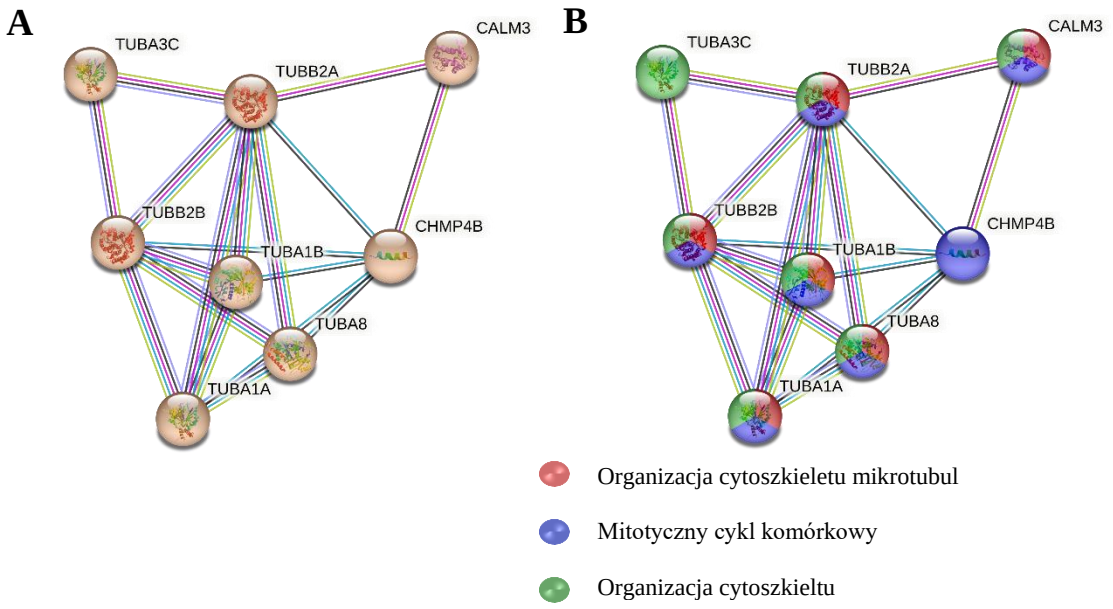
Rycina 4.55 Grupa 4. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 4. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów



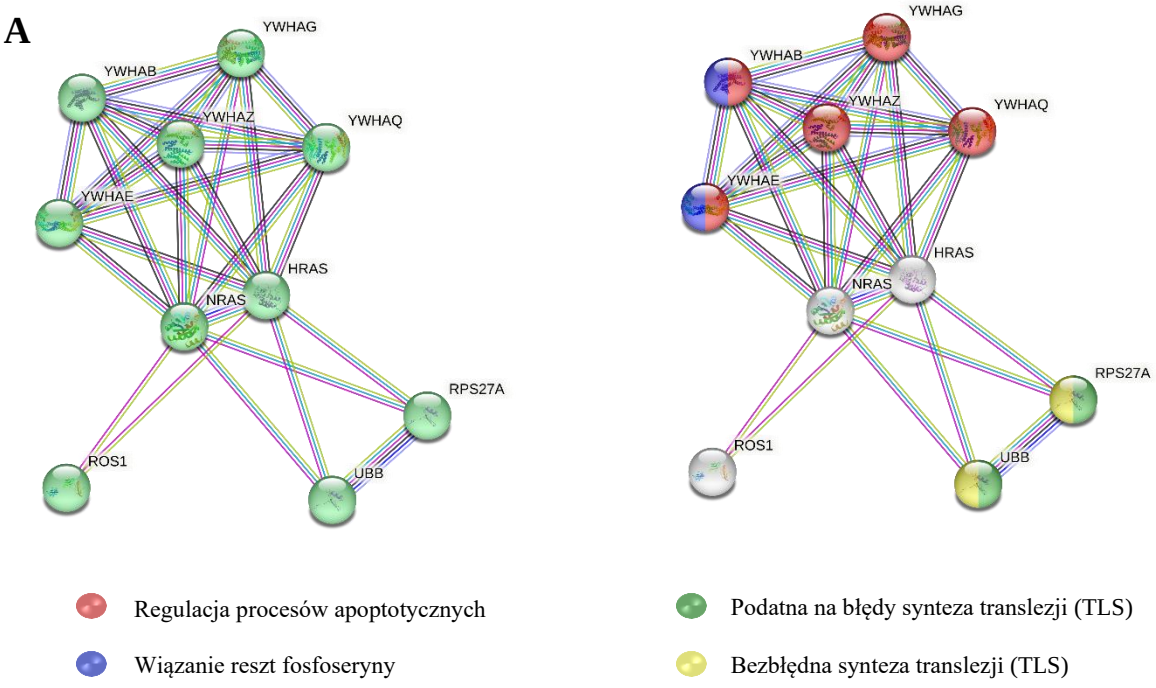
Rycina 4.56 Grupa 5. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 5. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



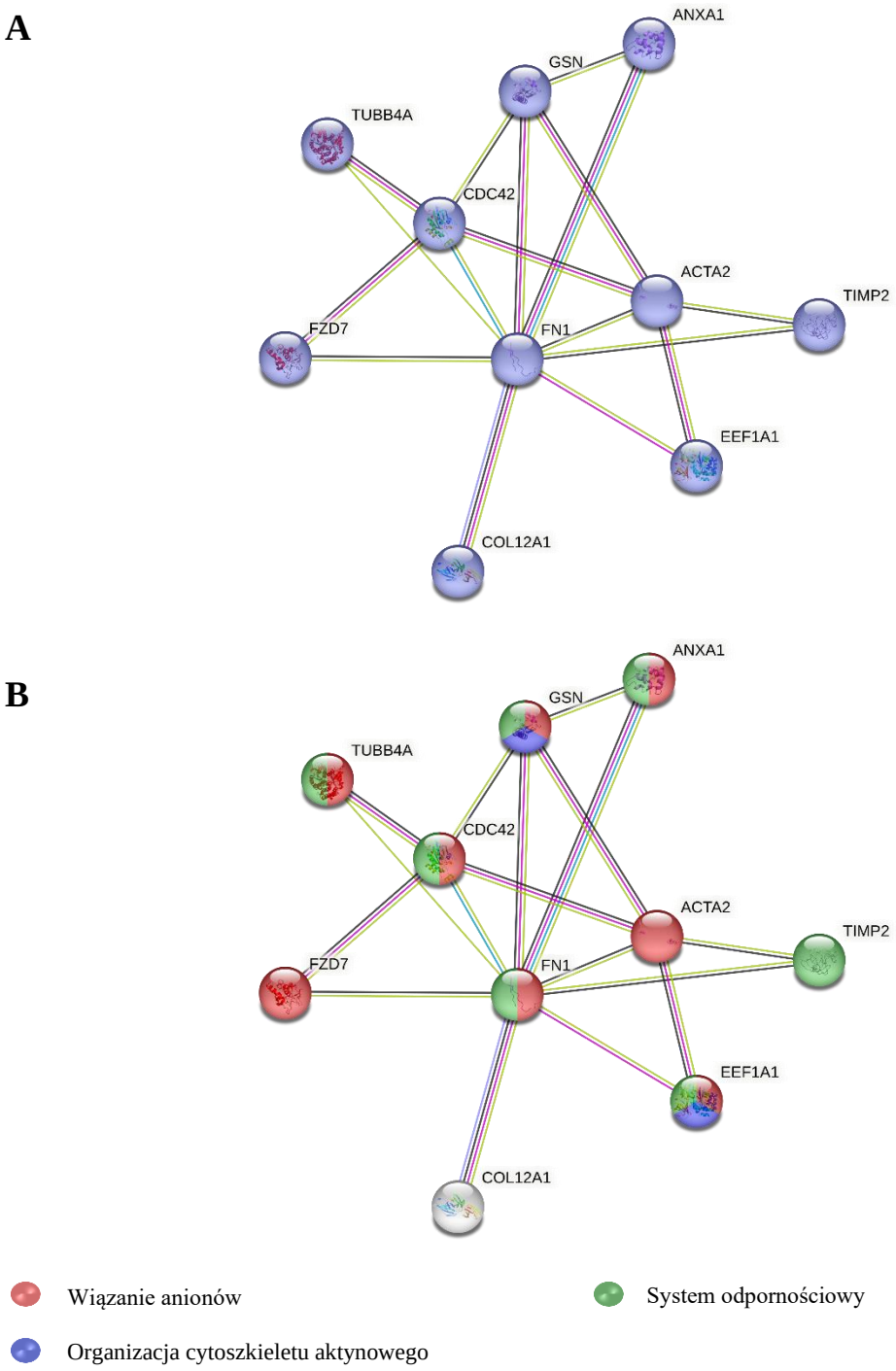
Rycina 4.57 Grupa 6. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 6. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



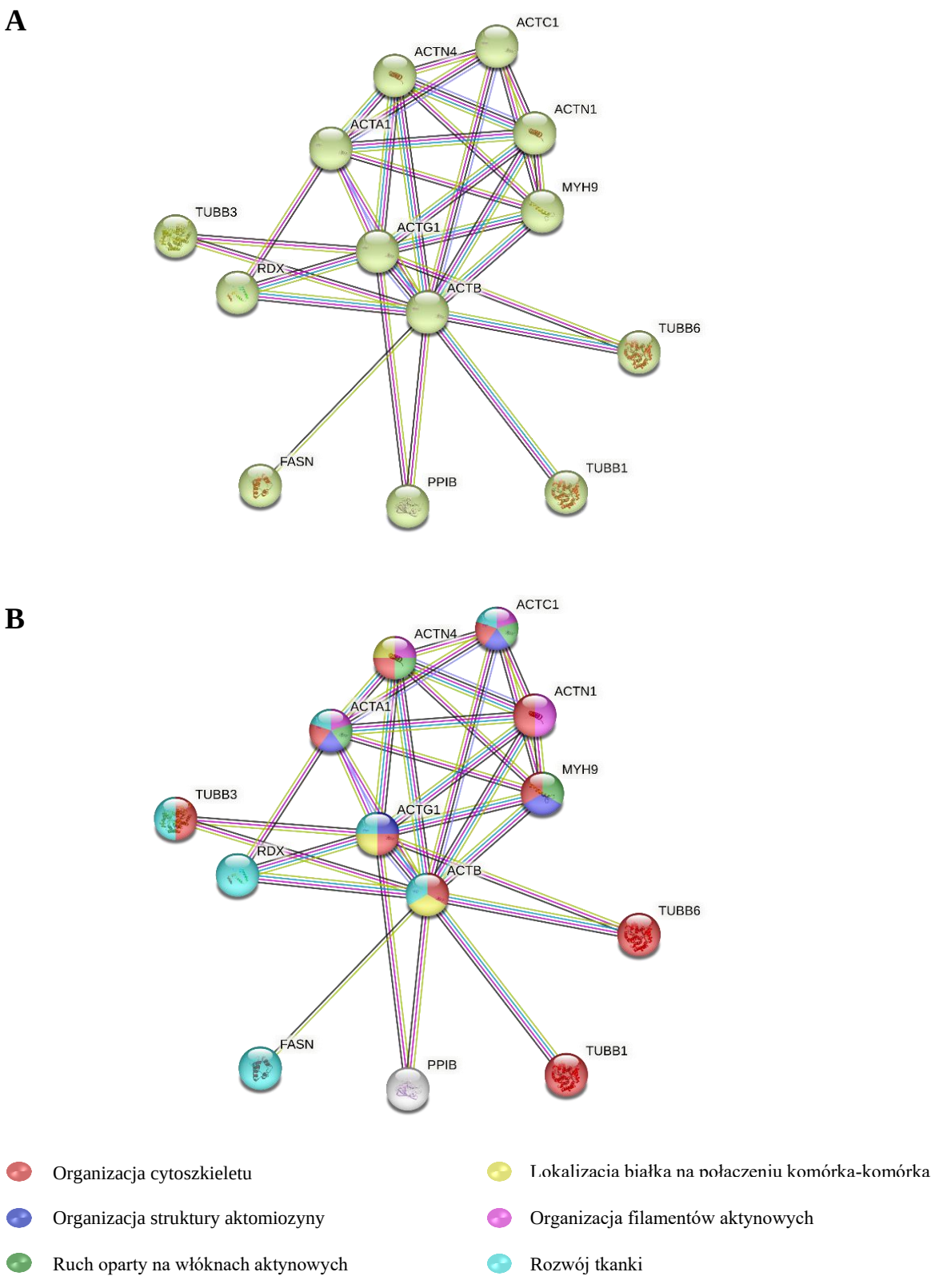
Rycina 4.58 Grupa 7. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 7. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów białek, fioletowy - homologia białek



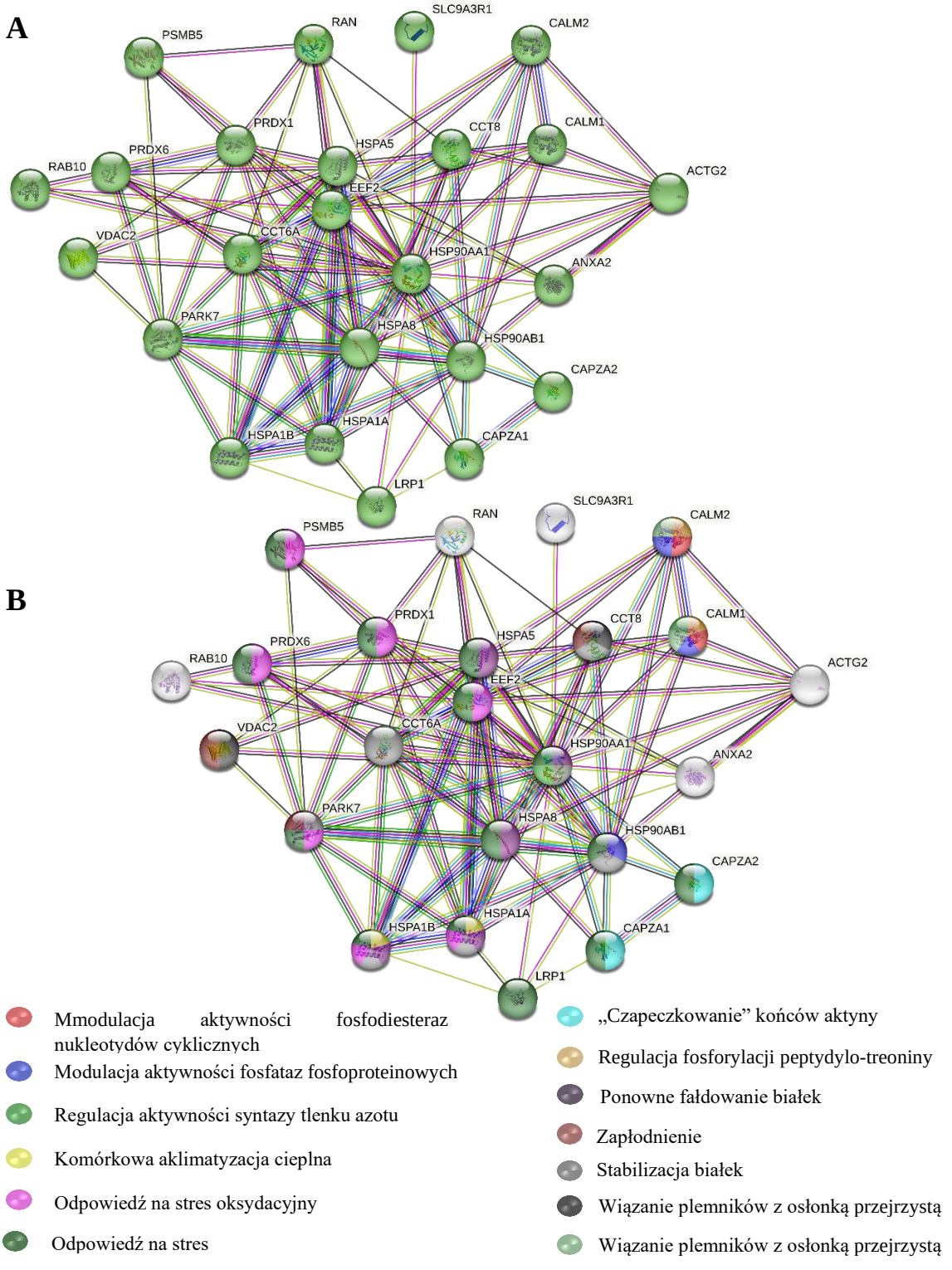
Rycina 4.59 Grupa 8. sieci interakcji białko-białko plam nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 8. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



Rycina 4.60 Grupa 9. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 9. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



Rycina 4.61 Grupa 10. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 10. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



Rycina 4.62 Grupa 11. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 11. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek.

Jeśli chodzi o plemniki to pierwszy klaster obejmował białka kodowana przez następujące geny: ACTA1, ACTB, ACTC1, ACTG1, CALM3, CCT7, CDC42, FASN, GSN, PPP1CB, RAP1B, RDX, SDHA, SDHB, SLC2A3, TGM2. W tym przypadku również występowało zróżnicowanie funkcjonalności białek. Są one odpowiedziane między innymi za metabolizm bursztynianu, tworzenie filamentów aktynowych oraz lokalizację białek w komórce. Interakcje występujące pomiędzy poszczególnymi rodzajami aktyn oraz radyksyn przyjmowały wartości pomiędzy 0,485 a 0,998. Spośród aktyn kluczową wydaje się być ACTB, która oddziałuje ze wszystkimi białkami omawianego kompleksu. Na podkreślenie zasługują interakcje tworzone przez gelsolinę (GSN) z ACTA1 (0.998), ACTB (0,874), ACTC1 (0,810), ACTG1 (0,981), które mogą potwierdzać istotną rolę omawianego białka w ostatecznym formowaniu mikrofilamentów aktynowych, zapobieganiu ich reorganizacji i ciliogenezie. Interakcja pomiędzy ACTB a podjednostką eta białka 1 T-kompleksu (CCT7) (0,791) może potwierdzać udział wielu białek z tej grupy w organizacji strukturalnej filamentów aktynowych. Z kolei interakcje pomiędzy homologiem białka 42 odpowiadającego za podziały komórkowe (CDC42) a białkiem RAP1B z rodziny Ras (RAP1B) (0,965) oraz podjednostką katalityczną beta fosfatazy PP1 serynowo-treoninowej (PPP1CB) (0,732) mogą wskazywać na rolę powyższych w regulacji cyklu komórkowego, proliferacji oraz migracji komórek **(Rycina 4.64)**.

Druga grupa składała się z białek kodowanych przez następujące geny: ACTA2, ALB, APOA1, CA2, CYCS, DDX1, FTH1, GOT1, RBP4, TF, TTR. Były to funkcjonalnie zróżnicowane białka. Są zaangażowane w remodelowanie cząsteczek HDL, transport i metabolizm retinoidów, wchłanianie i transport żelaza oraz potranslacyjną fosforylację białek. Albumina wchodziła w interakcje ze wszystkimi pozostałymi białkami tej grupy. Interakcje wykazywały przedziały ufności pomiędzy 0,461 a 0,987. Wysoka zawartość ALB w plazmie nasienia powoduje, że może ona opłaszczać powierzchnię zawieszonych w niej plemników. Może pełnić też rolę białka wiążącego inne polipeptydy. Podobnie jak w przypadku plazmy najsilniejsze oddziaływanie ALB dotyczyło APOA1, co potwierdza kooperację obydwu cząsteczek w utrzymaniu prawidłowej homeostazy lipidowej plemników (zwłaszcza stosunku lipidów budujących błony plazmatyczne). Na uwagę zasługuje bardzo silna interakcja ALB z cytochromem C (CYCS) (0,860), która może wskazywać na posiadanie przez albuminę domeny wiążącej CYCS. Jedno z białek to jest ATP-zależna helikaza RNA (DDX1) nie oddziaływała z pozostałymi białkami znajdującymi

się w tej grupie, ale oddziaływała z innymi polipeptydami sieci proteomicznej plemników **(Rycina 4.65)**.

Trzeci klaster obejmował polipeptydy kodowane przez następujące geny: ALDOC, CKB, CKM, CKMT2, ENO1, GAPDHS, GOT2, LDHB, MDH1, PGAM1, PGK1, PGK2, PKLR, PRDX1, TPI1, UQCRFS1. W większości były to enzymy zaangażowane w metabolizm plemników to jest glikolizę i glukoneogenezę, syntezę fosfokreatyny i ATP oraz procesy metaboliczne związane z przemianą NAD/NADH. Tutaj, podobnie jak w plazmie, najwięcej silnych interakcji zanotowano pomiędzy TPI1 a PGK1 (0,999), GAPDHS (0,997), PGK2 (0,996), ENO1 (0,996), ALDOC (0,982), GOT2 (0,971) i PKLR (0,956). Wskazuje to na ścisłe współdziałanie enzymów zawiadujących metabolizmem węglowodanów w plemnikach. Zaobserwowano też występowanie silnej interakcji pomiędzy TPI1 a podjednostką Rieske kompleksu cytochromu b-c1 (UQCRFS1) (0,703) oraz pomiędzy peroksyredoksyną 1 (PRDX1) a ENO1 (0,704). Pierwsze z odziaływań wskazuje na powiązanie metabolizmu węglowodanów z działaniem łańcucha oddechowego, natomiast drugie na współdziałanie enzymów w ochronie komórek poprzez neutralizowanie nadtlenków i stymulację produkcji immunoglobulin **(Rycina 4.66)**.

Grupa czwarta białek była kodowana przez następujące geny: FABP7, TUBA1A, TUBA1B, TUBA3C, TUBB3. Białka te są integralną częścią cytoszkieletu plemników, wykazują aktywność GTP-azową i wiążą GTP. Najsilniejsze interakcje zaobserwowano między łańcuchem beta 3 tubuliny (TUBB3) a pozostałymi łańcuchami tubulin to jest TUBA1A (0,993) i TUBA1B (0,997). Na uwagę zasługuje też interakcja pomiędzy TUBB3 a białkiem wiążącym kwasy tłuszczowe (FABP7) (0,544), która może wskazywać na udział omawianych polipeptydów w prawidłowym wykształcaniu komponentów strukturalnych i otaczających witkę plemnika **(Rycina 4.67)**.

Piąty klaster zawierał polipeptydy kodowane przez następujące geny: ACR, ASTL, PLCZ1, ZPBP. Wszystkie z wyżej wymienionych są białkami specyficznymi dla procesów aktywacji oocytu, wiązania się oocytu z plemnikiem oraz zapłodnienia. Podobnie jak w plazmie - pomiędzy omawianymi białkami występowały interakcje na poziomie średnim (przedział 0,426-0,575) (**Rycina 4.68)**.

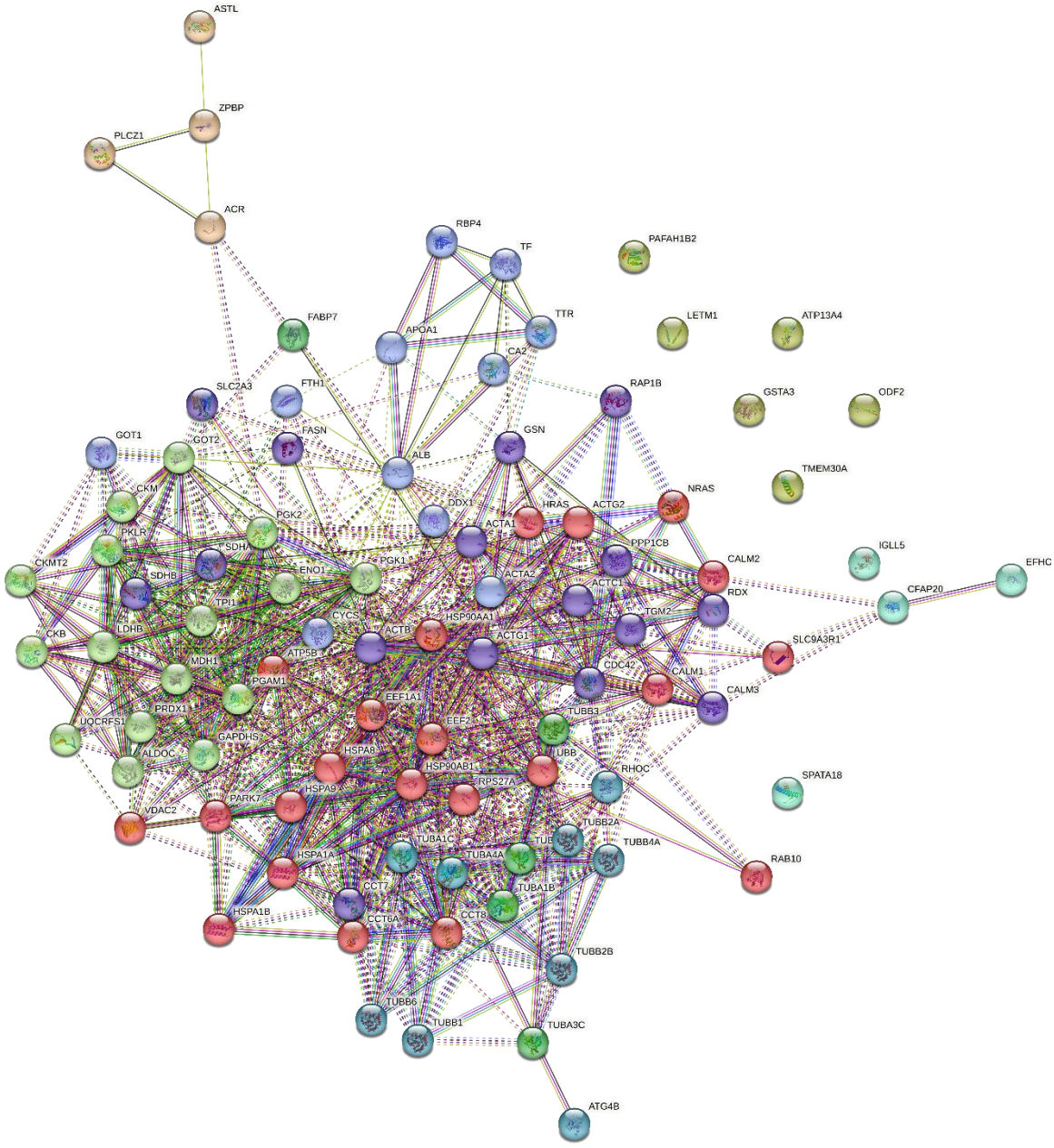
Szósta grupa białek była kodowana przez następujące geny: CFAP20, EFHC2, IGLL5, SPATA18. W omawianej grupie odnotowano tylko jedną interakcję o średnim przedziale ufności (0,470) pomiędzy CFAP20 a EFHC2 **(Rycina 4.69)**.

Siódmy klaster obejmował polipeptydy kodowane przez następujące geny: ATP13A4, GSTA3, LETM1, ODF2, PAFAH1B2, TMEM30A. W omawianej grupie nie odnotowano interakcji pomiędzy wymienionymi białkami **(Rycina 4.70)**.

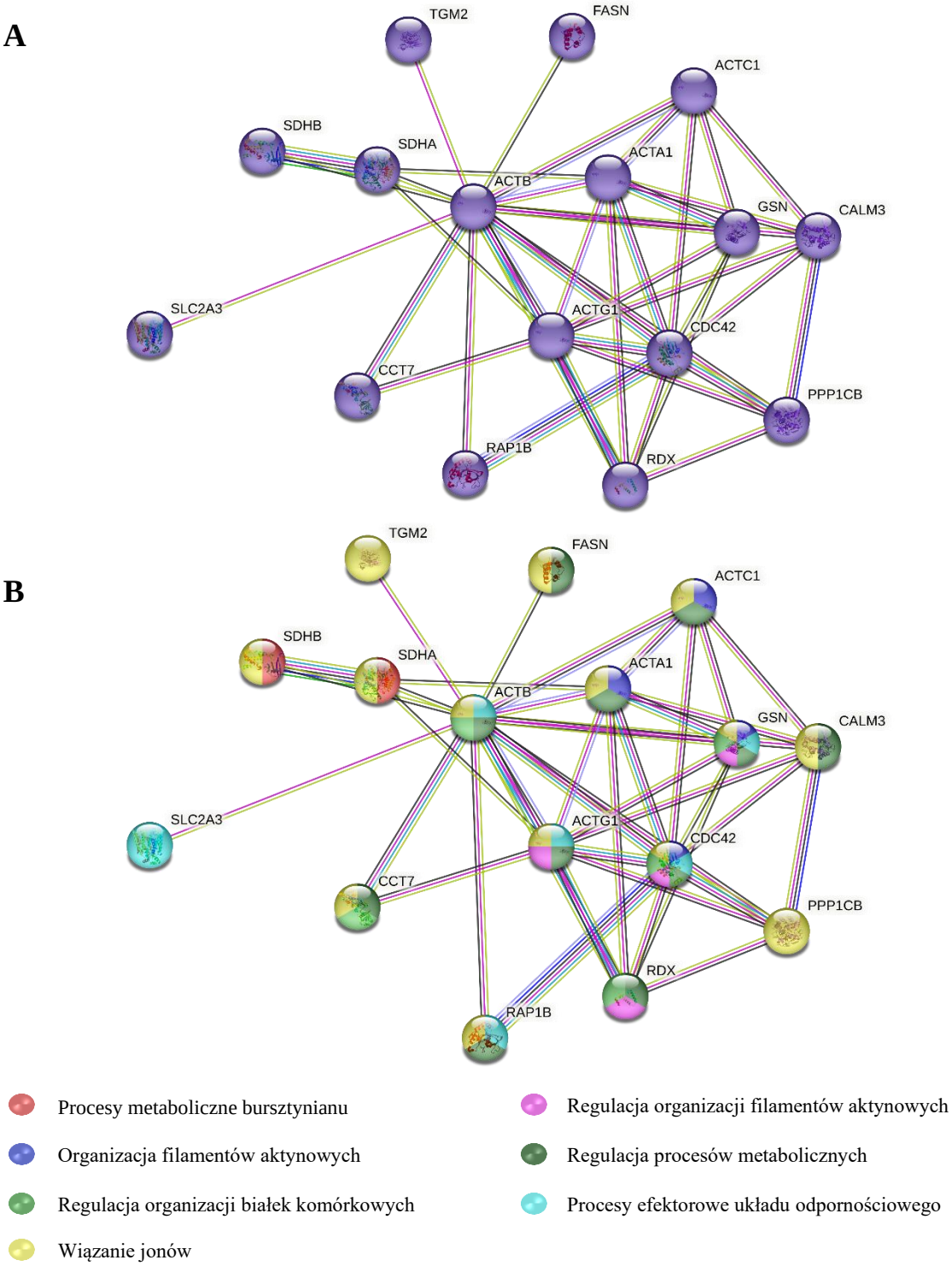
Ósma grupa białek była kodowana przez następujące geny: ATG4B, RHOC, TUBA1C, TUBA4A, TUBB1, TUBB2A, TUBB2B, TUBB4A, TUBB6. Wszystkie biorą udział w organizacji cytoszkieletu komórek. Występowanie silnych interakcji pomiędzy nimi potwierdza konieczność ich współdziałania w celu wykształcenia prawidłowo działającego aparatu ruchu plemników **(Rycina 4.71)**.

Ostatni klaster obejmował białka kodowane przez: ACTG2, ATP5B, CALM1, CALM2, CCT6A, CCT8, EEF1A1, EEF2, HRAS, HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1A, HSPA1B, HSPA8, HSPA9, NRAS, PARK7, RAB10, RPS27A, SLC9A3R1, UBB oraz VDAC2. Kodowane polipeptydy zaangażowane są w przystosowywanie się komórki do stresu cieplnego i/lub oksydacyjnego, modulowanie aktywności kinaz, fosfataz fosfoproteinowych oraz telomerazy, fałdowanie białek i ich stabilizację, różnicowanie komórek, regulację apoptotycznej ścieżki sygnałowej i jakości biologicznej komórek, wykrywanie uszkodzeń DNA, transdukcję sygnałów i transport wewnątrzkomórkowy. Kluczowym komponentem tej grupy najprawdopodobniej było białko HSP90AA1, które wchodziło w największą ilość silnych interakcji z pozostałymi białkami (przedział 0,431-0,999). Białka z rodziny HSP wykazywały najwięcej oddziaływań pomiędzy sobą. Najprawdopodobniej kierują one kontrolą jakości biologicznej tkanki poprzez wyłapywanie uszkodzonych form komórek, przeprowadzanie procesów naprawczych w komórkach lub ich kierowanie na odpowiednie ścieżki degradacyjne. Świadczy to o kompleksowej i wielopoziomowej ochronie komórek przed skutkami oddziaływań środowiska. Ponadto, małe molekularne chaperony takie jak podjednostki T-kompleksu (CCT6 i CCT8) mogą brać udział w fałdowaniu aktyn i tubulin a tym samym wpływać na ruchliwość plemników **(Rycina 4.72)**.

Podobieństwo sieci proteomicznych występujących w plazmie oraz plemnikach indora świadczy o ciągłej interakcji obu składowych nasienia w celu wytworzenia zdolnych do zapłodnienia gamet. Wyniki analiz wskazują na możliwość przechodzenia części białek plemnikowych do plazmy a także opłaszczania wybranych białek plazmowych na powierzchni plemników.

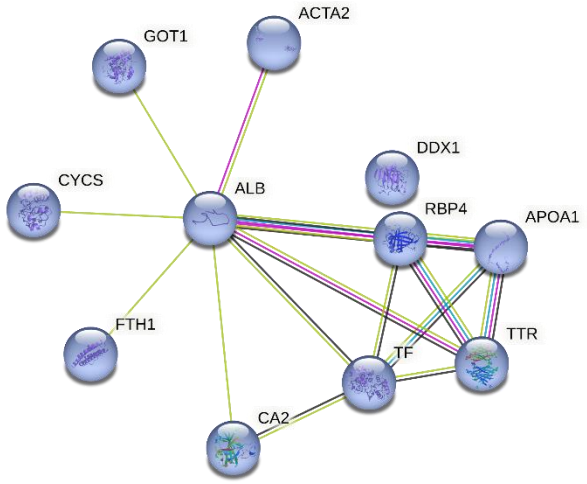


Rycina 4.63 Analiza sieci interakcji białko-białko pomiędzy zidentyfikowanymi fosfoproteinami ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia indorów przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. Wszystkie białka podzielono na 9 grup funkcyjnych. Linie łączące poszczególne białka to interakcje występujące pomiędzy nimi, a kolory linii oznaczają: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, czerwone – prawdopodobne interakcje na podstawie fuzji genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek. Linie przerywane reprezentują interakcje pomiędzy białkami z różnych grup

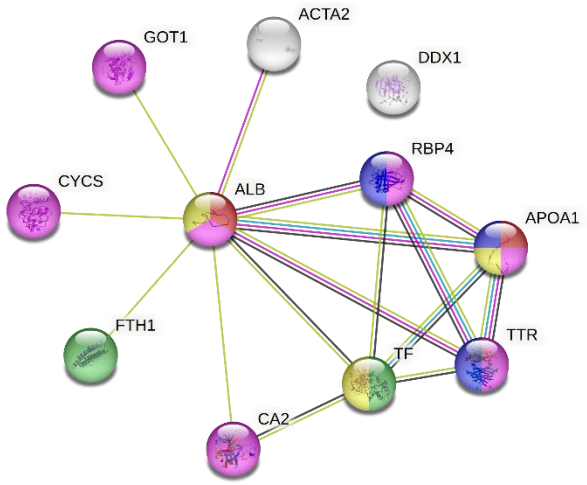


Rycina 4.64 Grupa 1. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 1. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek

A



B



Przebudowa HDL

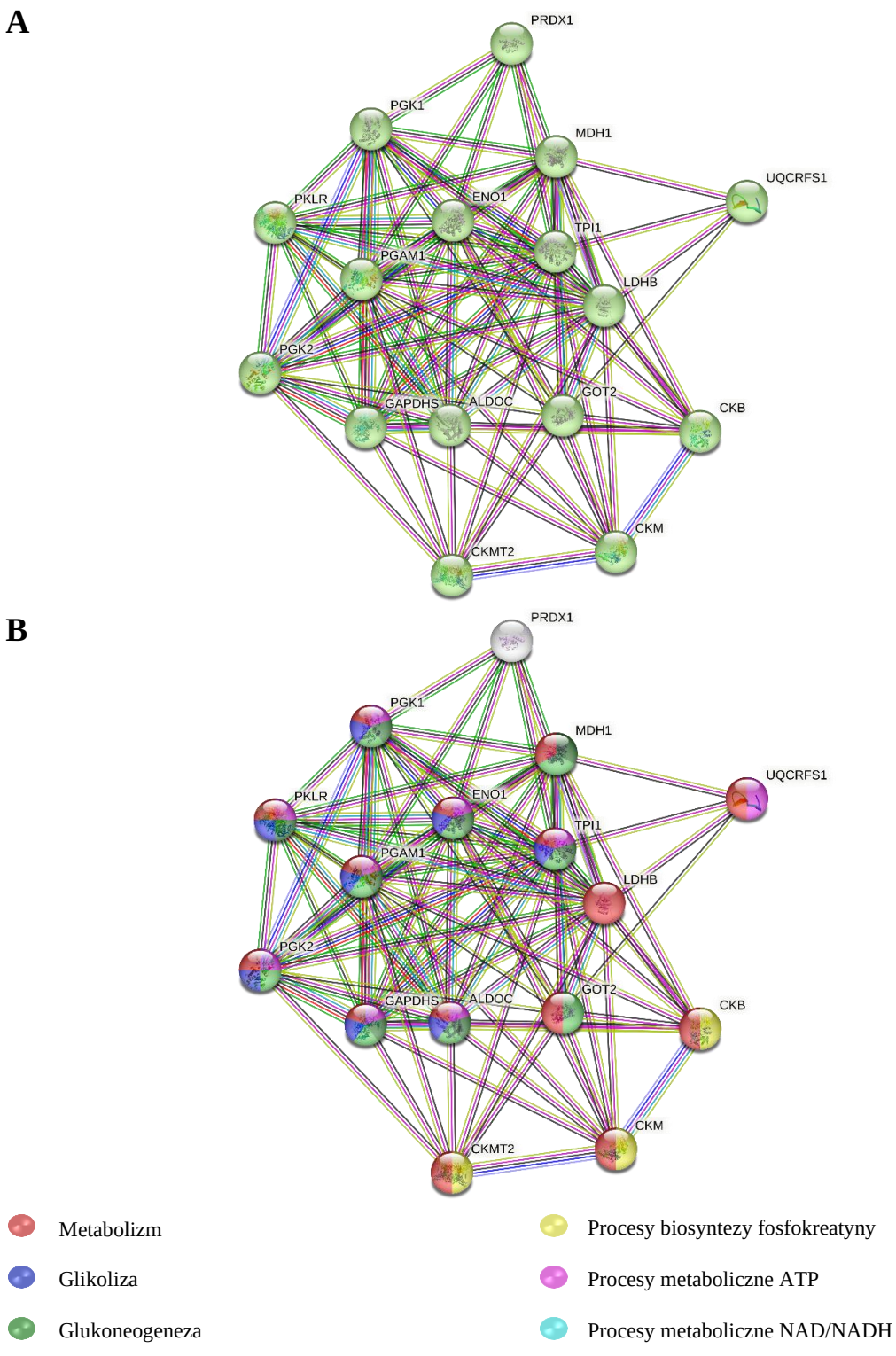
Potranslacyjna fosforylacja białek

Metabolizm i transport retinoidów

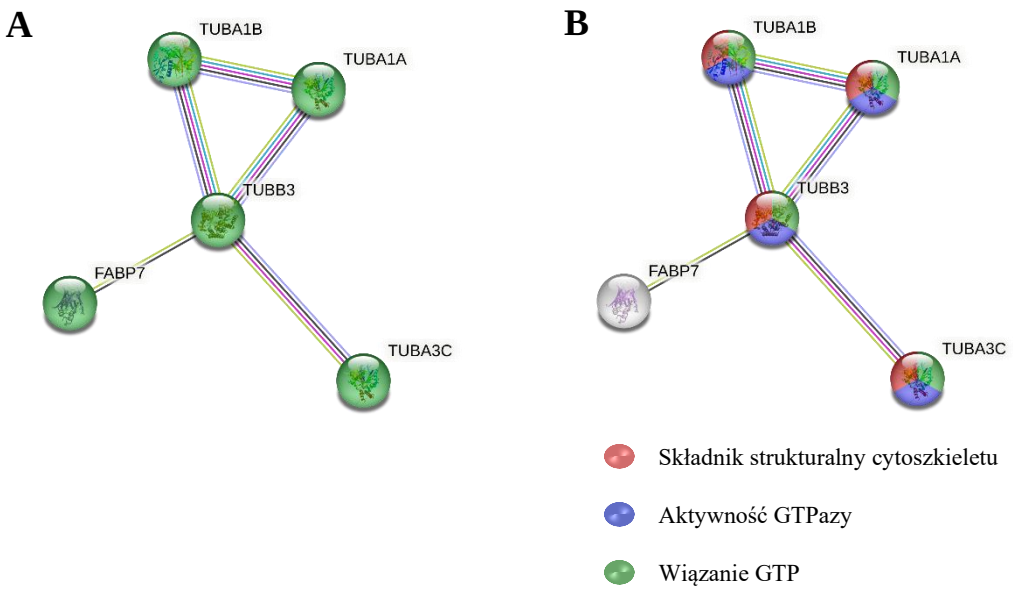
Metabolizm

Wchłanianie i transport żelaza

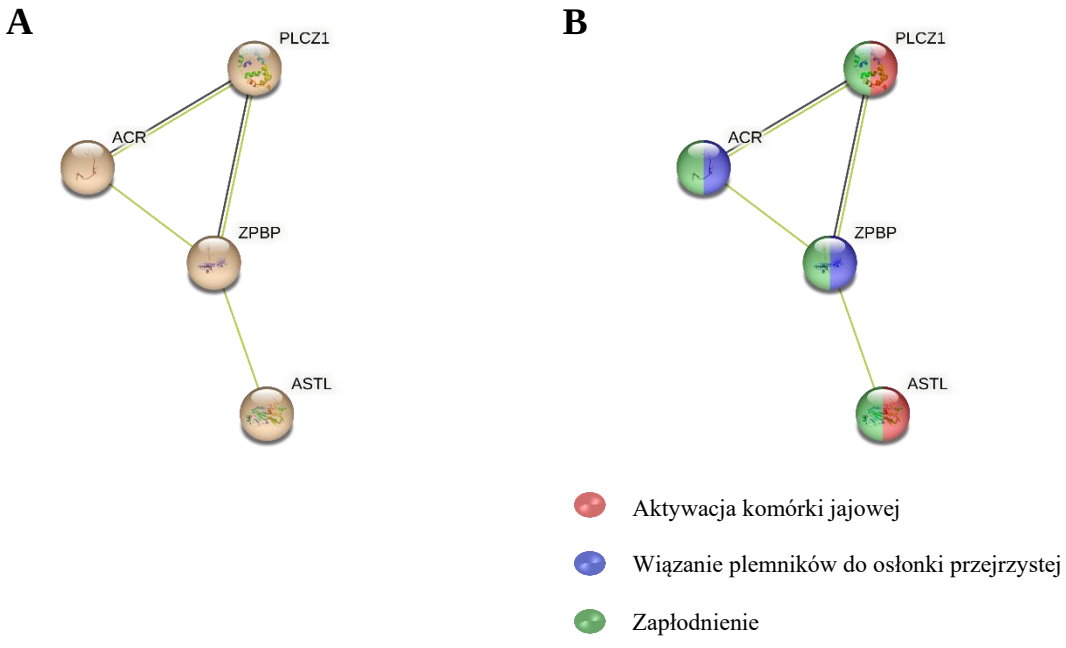
Rycina 4.65 Grupa 2. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 2. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów



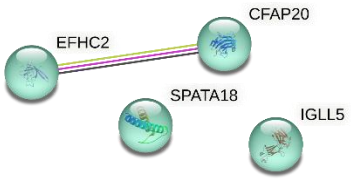
Rycina 4.66 Grupa 3. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 3. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, czerwone – prawdopodobne interakcje na podstawie fuzji genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



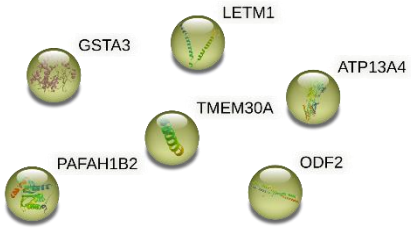
Rycina 4.67 Grupa 4. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 4. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, czerwone – prawdopodobne interakcje na podstawie fuzji genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek



Rycina 4.68 Grupa 5. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 5. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów

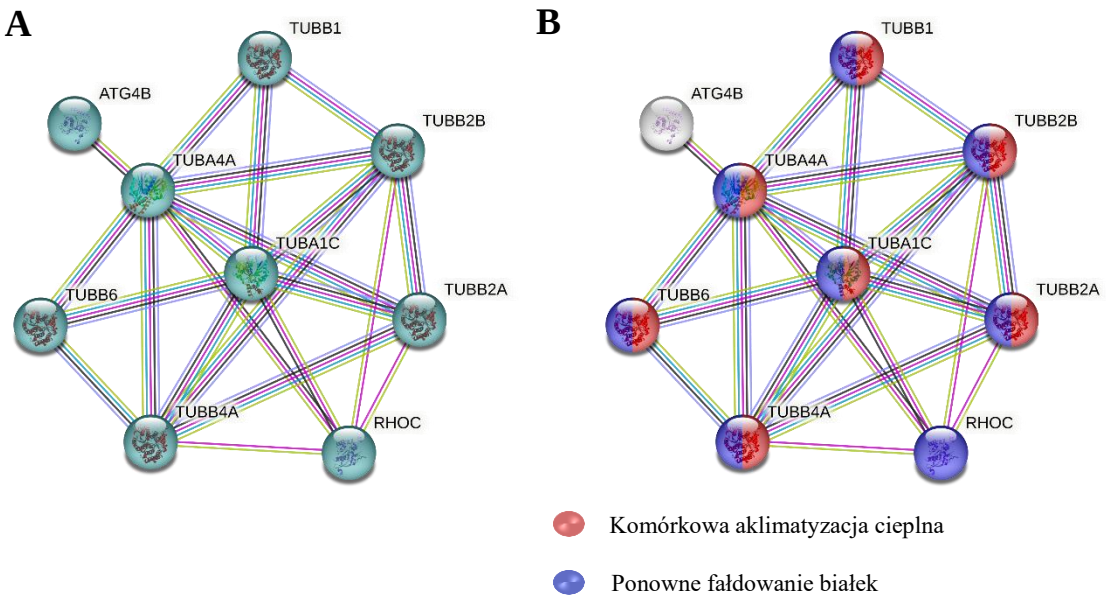


Rycina 4.69 Grupa 6. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów

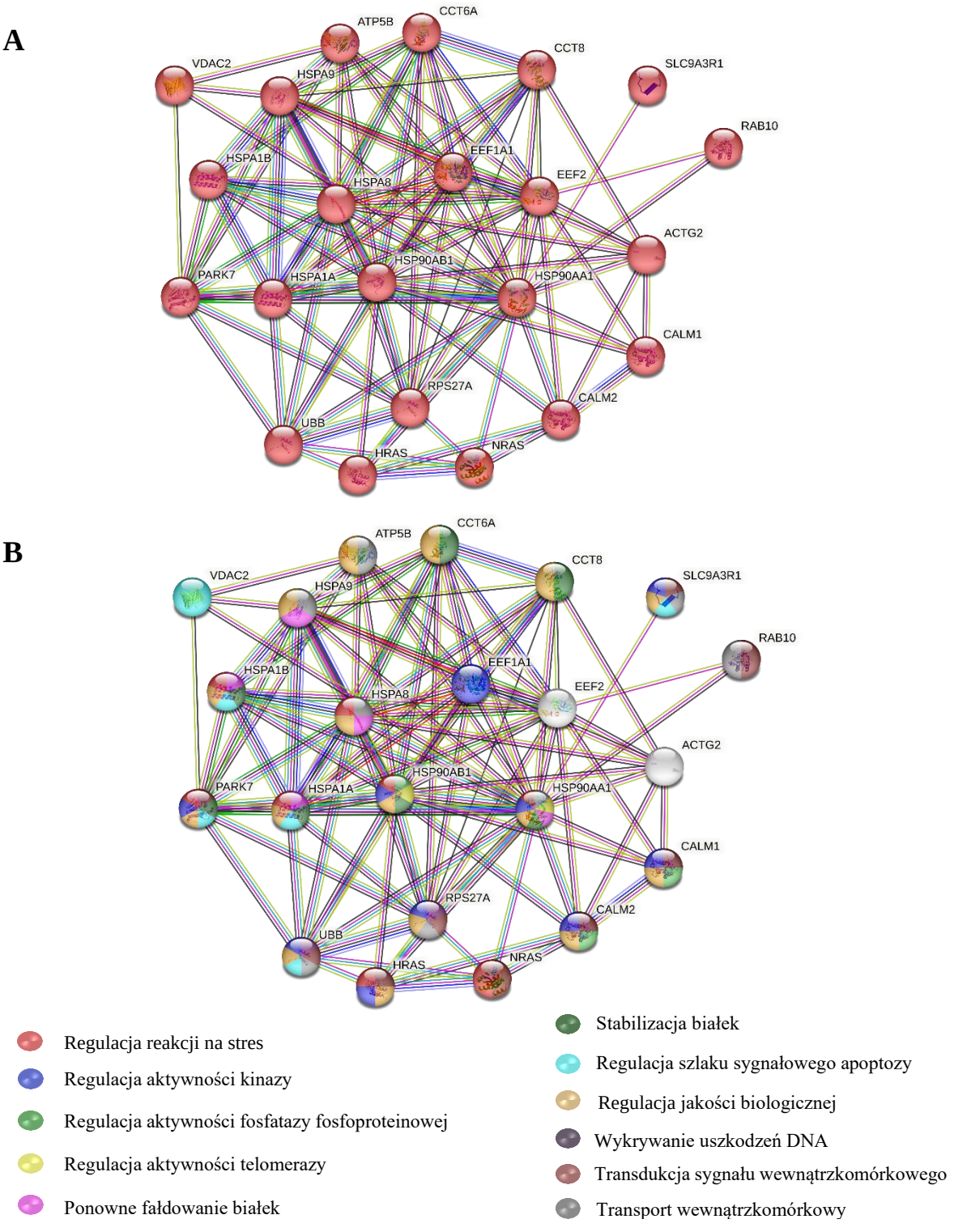


Wyszczególnione białka występowały w plazmie nasienia i najprawdopodobniej opłaszczały plemniki.

Rycina 4.70 Grupa 7. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5.



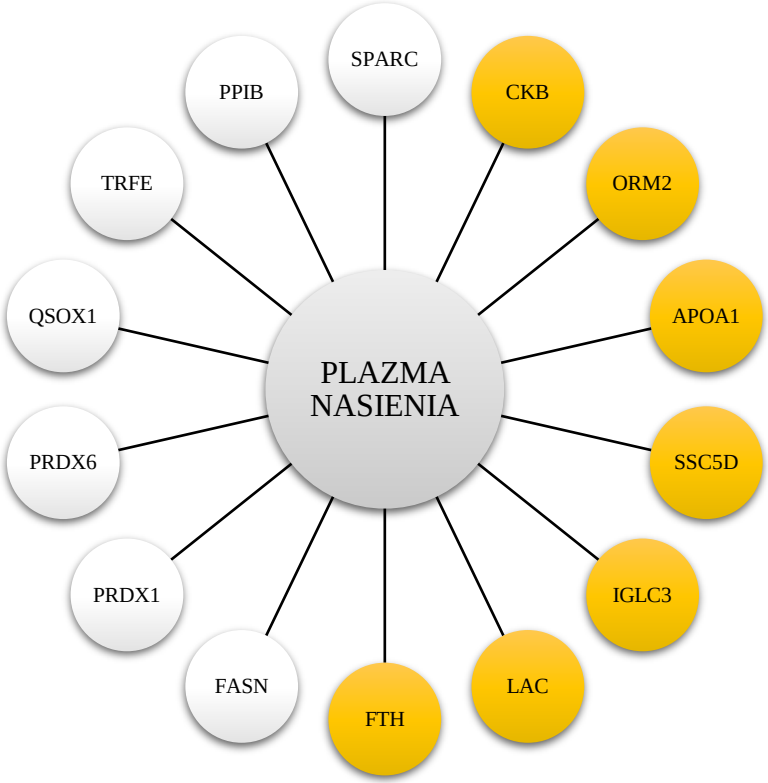
Rycina 4.71 Grupa 8. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 8. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek.



Rycina 4.72 Grupa 9. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 9. (B). Kolory linii oznaczają rodzaje interakcji: turkusowe - znane interakcje z wyselekcjonowanych baz danych, różowe - znane interakcje określone eksperymentalnie, zielone – przewidywane interakcje na podstawie sąsiedztwa genów, czerwone – prawdopodobne interakcje na podstawie fuzji genów, niebieskie - przewidywane interakcje współwystępowania genów w szlakach metabolicznych, żółte – dane pochodzące z analizy baz danych, **czarne** – koekspresja genów, fioletowy - homologia białek

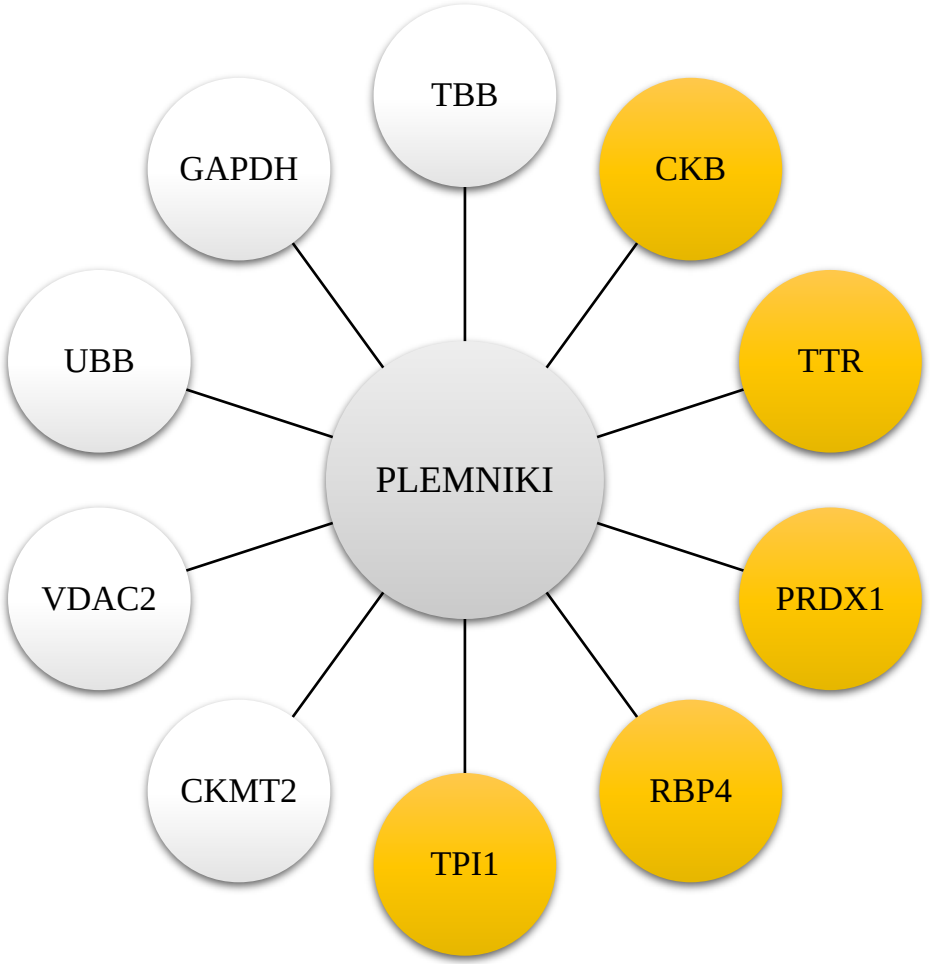
4.12. Różnice występujące w obrębie fosfoproteomu nasienia indorów

Na poniższych schematach przedstawiono geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w nasieniu białym i żółtym niezależnie od sezonu **(Rycina 4.73, Rycina 4.74)** oraz podczas sezonów wiosenno-letniego i jesienno-zimowego bez względu na rodzaj nasienia **(Rycina 4.75, Rycina 4.76)**.



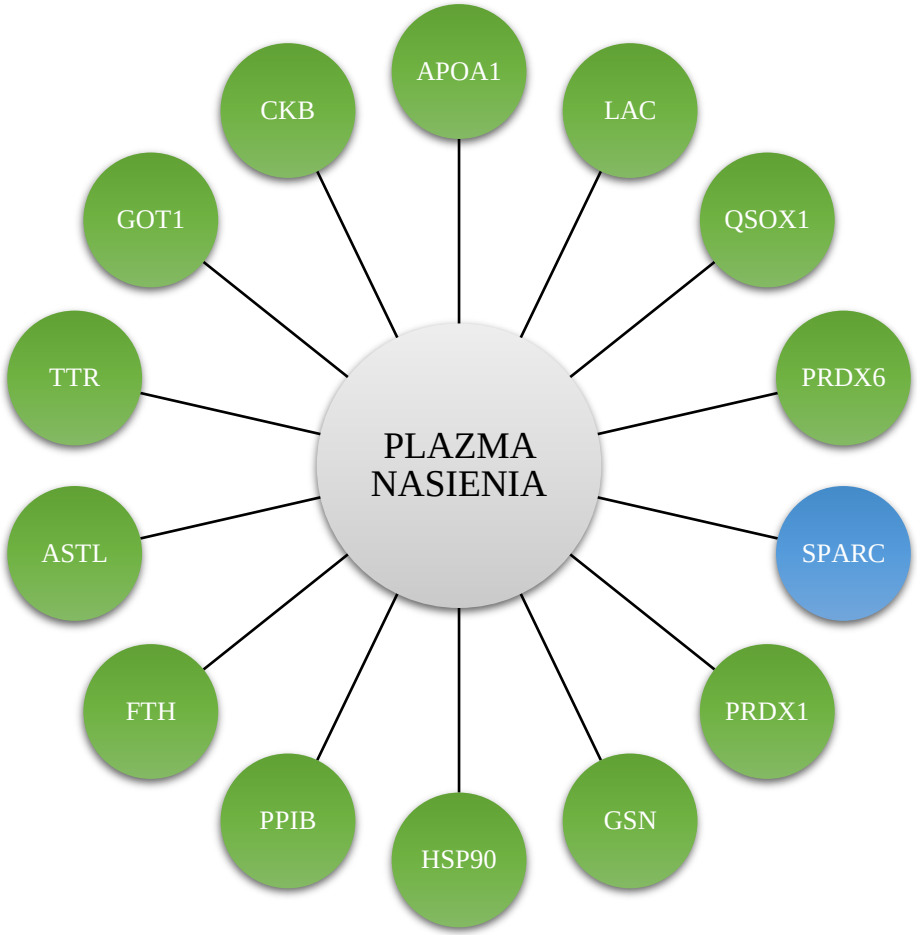
Gen	Białko
SPARC	Białko SPARC
PPIB	Peptydylo-prolyl cis/trans izomeraza B
TRFE	Owotransferyna
QSOX1	Oksydaza sulfhydrylowa 1
PRDX1	Peroksyredoksyna-1
PRDX6	Peroksyredoksyna-6
FASN	Syntaza kwasów tłuszczowych
CKB	Kinaza kreatynowa podtyp B
ORM2	Białko podobne do alfa-1 kwaśnej glikoproteiny 2
APOA1	Apolipoproteina A1
SSC5D	Podobny do SSC5D rozpuszczalny receptor nekrofagotyczny zawierający domenę bogatą w cysteinę
IGLC3	Łańcuch lekki immunoglobuliny ze stałym regionem
LAC	Łańcuch C immunoglobuliny lambda
FTH	Łańcuch ciężki ferrytyny

Rycina 4.73 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plamie nasieniu białego (kolor biały) i żółtego (kolor żółty)



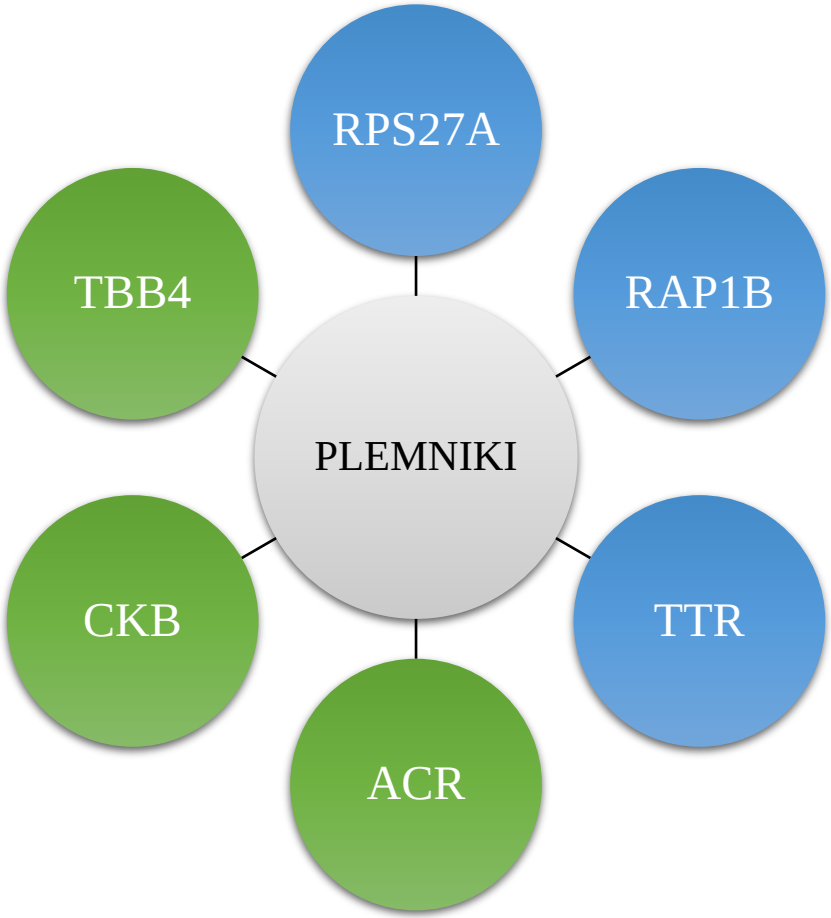
Gen	Białko
TBB	Tubuliny
GAPDH	Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
UBB	Poliubikwityna B
VDAC2	Białko 2 aniono i napięciozależnego kanału jonowego
CKMT2	Kinaza kreatynowa typu S (forma mitochondrialna)
CKB	Kinaza kreatynowa podtyp B
TTR	Transtyretyna
PRDX1	Peroksyredoksyna-1
RBP4	Białko 4 wiążące retinol
TPI1	Izomeraza triozofosforanowa

Rycina 4.74 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plemnikach nasienia białego (kolor biały) i żółtego (kolor żółty)



Gen	Białko
PRDX1	Peroksyredoksyna-1
PRDX6	Peroksyredoksyna-6
GSN	Gelsolina
HSP90	Białko szoku termicznego 90 kDa
PPIB	Peptydylo-prolyl cis/trans izomeraza B
FTH	Łańcuch ciężki ferrytyny
ASTL	Metaloendopeptydaza z rodziny astacyn
TTR	Transtyretyna
GOT1	Aminotransferaza asparaginowa (forma cytoplazmatyczna)
CKB	Kinaza kreatynowa podtyp B
APOA1	Apolipoproteina A1
LAC	Łańcuch C immunoglobuliny lambda
QSOX1	Oksydaza sulfhydrylowa 1
SPARC	Białko SPARC

Rycina 4.75 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plazmie nasienia pochodzącego z sezonu wiosenno-letniego (kolor zielony) i jesienno-zimowego (kolor niebieski)



Gen	Białko
TBB4	Łańcuch beta-4 tubuliny
CKB	Kinaza kreatynowa podtyp B
ACR	Akrozyna
RPS27A	Białko 27A rybosomu 40s skoniugowanego z ubikwityną
RAP1B	Białko RAP1B z rodziny Ras
TTR	Transtyretyna

Rycina 4.76 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plemnikach nasienia pochodzącego z sezonu wiosenno-letniego (kolor zielony) i jesienno-zimowego (kolor niebieski)

5. Dyskusja

W latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku **Saeki i Brown (1962)** zauważyli, że indory produkujące nasienie o żółtej barwie nie uzyskują porównywalnych wskaźników zapładnialności jaj do indorów produkujących białe nasienie. Zaobserwowane zależności potwierdził **Cherms (1968)**. W kolejnych latach **Thurston i inni (1975)** odkryli, że nasienie o żółtej barwie zawiera znacznie więcej nieprawidłowo rozwiniętych spermatyd oraz makrofagów. **Thurston i inni (1982)** zaproponowali także wprowadzenie podziału ejakulatów indorów na te, które cechowały się lepszymi parametrami przyżyciowymi plemników i niższą zawartością białka w plazmie nasienia – białe oraz tymi prezentującymi gorsze właściwości i wyższą zawartość białka w plazmie – żółte. Od tego momentu barwa nasienia stała się głównym wyznacznikiem przydatności nasienia do procesu sztucznej inseminacji indyczek na fermach zarodowych. Potwierdzały to kolejne badania, które donosiły, że nasienie żółte cechuje się znacznie wyższą zawartością cholesterolu, albuminy, transtyretyny, hemopeksyny, immunoglobulin, białka podobnego do proteinazy, malonylo-CoA i pirofosforanu fernezylu (FPP) oraz spadkiem zawartości monojodotyrozyny **(Hess i Thurston 1984; Słowińska in. 2015; Słowińska i in. 2017; Słowińska i in. 2018)**. Dlatego podział ejakulatów na dobre i złe, w zależności od ich barwy, jest stosowany na fermach do dziś.

5.1. Wpływ rodzaju ejakulatu na parametry nasienia indora

W niniejszych badaniach wykazano statystycznie istotne różnice w parametrach charakteryzujących nasienie białe oraz z syndromem YSS u indorów. Potwierdzają one wcześniejsze doniesienia o niższej zawartości białka całkowitego **(Thurston i in. 1982; Hess i Thurston 1984)** oraz albuminy **(Słowińska i in. 2019)** w białych plazmach nasienia. **Hess i Thurston (1982)** zaobserwowali wyższe aktywności AspAT, ACP oraz SOD w plazmie nasienia żółtego. W niniejszej pracy zanotowano statystycznie istotne różnice w aktywnościach fosfataz kwaśnej i alkalicznej. Zdecydowanie wyższe aktywności wspomnianych enzymów prezentowały ejakulaty z syndromem YSS. Nie zanotowano natomiast różnic w aktywnościach dysmutazy ponadtlenkowej w obu rodzajach nasienia. Według **Słowińskiej i innych (2011)** w nasieniu z syndromem YSS obserwuje się wyższą aktywność SOD, gdzie stanowi ona jedną z głównych barier antyoksydacyjnych układu. Rozbieżność uzyskanych wyników może wynikać z wykorzystania w niniejszych badaniach

nasienia innej linii indorów. Pozostałe badane enzymy antyoksydacyjne to jest peroksydaza glutationowa oraz katalaza wykazywały zróżnicowaną aktywność. Aktywność GPx była niemal dwukrotnie niższa w nasieniu białym, natomiast CAT pozostawała na porównywalnym poziomie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w plazmie nasienia YSS zanotowano statystycznie istotnie wyższą zawartość glutationu oraz malondialdehydu co może potwierdzać teorię o wzmożonej ochronie antyoksydacyjnej plemników nasienia żółtego. Spowodowane może być to nasilonym procesem peroksydacji lipidów błonowych. **Słowińska i inni (2018)** zauważyli, że peroksydację mogą nasilać znaczące ilości malonylo-CoA obecne w plazmie YSS. Niewłaściwy metabolizm lipidów może przyczyniać się do powstawania licznych wakuol tłuszczowych w różnych odcinkach układu rozrodczego samców produkujących ejakulaty YSS **(Słowińska i in. 2017)**. Większa ilość wakuol może z kolei podlegać procesom peroksydacji i generowania nadtlenków lipidów, a to może bezpośrednio wzbudzać intensywniejsze zabezpieczenie antyoksydacyjne plazmy nasienia z syndromem YSS.

Rodzaj nasienia wpływał także znacząco na parametry plemników. Statystycznie istotnie wyższe wartości parametrów TMOT, VCL i BCF obserwowano w nasieniu białym. Z kolei w nasieniu żółtym notowano statystycznie istotnie wyższe parametry VSL, STR i LIN. Plemniki charakteryzujące się wyższym parametrem VCL posiadają mniej sfragmentowane DNA, a co za tym idzie wyższy potencjał zapładniający **(Fréour i in. 2010)**. **Domosławska i inni (2013)** wykazali, że parametry VAP, VCL, VSL i BCF są dobrymi wskaźnikami potencjału zapładniającego plemników psów i wskazują na ich zdolność do ruchu progresywnego i penetracji osłony przejrzystej komórki jajowej **(Verstegen i in. 2002)**. Ponadto w plemnikach mężczyzny wyższe parametry VCL i BCF korelowały z wydajniejszą i szybszą penetracją komórek jajowych w próbach przeprowadzanych *in vitro* **(Fetterflof i Rogers 1990)**. Jak podają **Pilane i Mapeka (2021)** podwyższone wartości parametrów STR i LIN korespondują z wystąpieniem zjawiska stresu oksydacyjnego w nasieniu kogutów oraz pozytywnie korelują z odsetkiem plemników posiadających fragmentowane DNA u mężczyzn **(Ayad i in. 2021)**. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy mogą więc potwierdzać obniżoną jakość plemników pochodzących z nasienia YSS w stosunku do plemników z nasienia białego i wskazywać na większą podatność żółtego nasienia na wystąpienie w nim zjawiska stresu oksydacyjnego.

Wiele badań wykazało, że wybrane antyoksydanty chronią błonę plazmatyczną plemników przed uszkodzeniami, a tym samym zwiększają ich przeżywalność **(Khan i in.**

2012). Plemniki z ejakulatów z syndromem YSS charakteryzowały się niższą koncentracją, integralnością błon komórkowych, funkcjonalnością mitochondriów oraz wyższą aktywnością wybranych enzymów antyoksydacyjnych takich jak SOD, GPx i CAT. Uzyskane wyniki są zgodne z rezultatami uzyskanymi przez **Koziorowską-Gilun i innych (2016)**, którzy wykazali, że aktywność CAT jest czterokrotnie, a aktywność SOD niemal dwukrotnie, wyższa w plemnikach YSS w porównaniu z plemnikami z nasienia białego. Dowiedziono istnienia pozytywnej ($p \leq 0,05$) korelacji pomiędzy aktywnością dysmutazy i negatywnej pomiędzy aktywnością katalazy a funkcjonalnością mitochondriów w nasieniu białym **(Koziorowska-Gilun i in. 2016)**, które potwierdzają rezultaty **Kobayashiego i innych (1991)** sugerujące, że aktywność SOD w plemnikach znacząco koreluje z odsetkiem ruchliwych gamet. Omawiane korelacje nie zostały potwierdzone w toku prowadzonych badań. Z kolei w plemnikach pochodzących z nasienia YSS wykazano istnienie dodatnich korelacji pomiędzy aktywnością CAT, aktywnością GPx a integralnością błon w rejonie akrosomowym **(Koziorowska-Gilun i in. 2016)**, co potwierdziły badania prowadzone w ramach niniejszej pracy. Wyżej wymienieni autorzy zasugerowali, że gorsza jakość plemników pochodzących z nasienia YSS może być związana z obniżonymi parametrami PMI oraz MMP. Wyniki naszych badań potwierdziły ten wniosek i jednocześnie wskazały na wzmożoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych w plemnikach. Ponadto udokumentowano statystycznie istotnie wyższą zawartość zredukowanego glutationu (GSH) w plemnikach od osobników z YSS. Nadmiar GSH jest często przyczyną stresu redukcyjnego, którego skutkiem jest zaburzenie równowagi stanu redoks i cytotoksyczności. Co ciekawe, zwiększona pula mitochondrialnego GSH wpływa na łańcuch transportu elektronów, prowadząc do generowania nadmiernych ilości anionorodnika ponadtlenkowego, a tym samym zwiększania aktywności SOD w plemnikach (**Zhang i in. 2012**). Nasilona ochrona antyoksydacyjna gamet może być spowodowana przez próbę podtrzymywania przez nie funkcjonalności własnych mitochondriów. Plemniki zawierają liczne mitochondria, które są niezbędne do zapewnienia energii dla ruchu gamety. Produkcja RFT znacząco wzrasta w uszkodzonych czy strukturalnie naruszonych mitochondriach, co z kolei może prowadzić do upośledzenia ich funkcji **(Evenson i in. 1982)**. **Gomez i inni (1998)** podali, że ilość RFT generowanych przez gamety jest odwrotnie proporcjonalna do jakości plemników w świeżym ejakulacie. Co więcej, dowiedziono istnienia statystycznie istotnej korelacji pomiędzy obecnością produktów peroksydacji lipidów w nasieniu a znaczącym spadkiem ruchliwości plemników mężczyzn **(Alvarez i in. 1987)**.

5.2. Wpływ sezonu na parametry nasienia indora

Badania wykazały, że podwyższona temperatura negatywnie wpływa na plemniki, w tym ich koncentrację w ejakulacie, morfologię, ruchliwość, skład ich błony komórkowej oraz integralność DNA **(Rahman i in. 2018)**. Ejakulaty pobierane w okresie wiosenno-letnim zwykle wykazują obniżone parametry jakościowe w stosunku do ejakulatów pobieranych w chłodniejszych miesiącach roku. Jest to konsekwencja wybranych czynników, takich jak choćby adaptacja organizmu do stresu cieplnego czy obniżony poziom hormonów gonadalnych **(Murase i in. 2007)**. Z przeprowadzonych analiz wynika, że sezon znacząco wpływa na parametry nasienia indora. W przemysłowej produkcji drobiarskiej uważa się, że pora roku nie wpływa na funkcjonowanie układów rozrodczych samców indorów, a więc i jakość ich ejakulatów. Tłumaczy się to faktem zachowywania właściwych dla gatunku, jednolitych i optymalnych warunków utrzymania podczas całego okresu odchowu ptaków. Z drugiej strony sezonowość rozrodu ptaków wydaje się być mocno zależna od szybkich zmian zachodzących w fotoperiodzie **(Dawson i in. 2001)**. Długość dnia świetlnego warunkuje przebieg dojrzewania płciowego, nieśność, długotrwałość pobierania paszy czy spoczynku. Ptaki posiadają wewnętrzny rytm reprodukcyjny, który jest zsynchronizowany z sezonowymi zmianami zachodzącymi w środowisku, a zwłaszcza wydłużaniem dnia świetlnego. Na rytm sezonowy składają się, wszelkie osobnicze odpowiedzi na fotoperiod w postaci przeplatających się reakcji fotosensytywności oraz fotorefrakcji. Sezon rozrodczy ptaków rozpoczyna się na jesieni, kiedy ptaki stają się fotosensytywne. Moment wystąpienia gotowości reprodukcyjnej jest wtedy warunkowany działaniem swoistego „napędu" podwzgórzowego oraz wrażliwością, zarówno podwzgórza jak i przysadki, na hamujące działanie gonadalnych hormonów steroidowych. Jeśli wrażliwość jest wysoka, to wzrost gonad nie nastąpi aż do momentu przekroczenia progu długości dnia świetlnego po okresie przesilenia zimowego. W takim wypadku okres składania jaj rozpocznie się dopiero późną zimą, wiosną lub nawet latem. Z drugiej strony, jeśli hamujące działanie hormonów steroidowych będzie relatywnie niskie, a wzrost gonad będzie postępował, to ptaki szybko staną się fotosensytywne, a co za tym idzie sezon rozpocznie się późną jesienią lub zimą. Na zapoczątkowanie okresu składania jaj wpływ mają także hierarchia stada, dostępność jedzenia, temperatura lub nawet pora deszczowa. Co ciekawe, u niektórych gatunków ptaków, mają one znacznie większe znaczenie w rozpoczęciu sezonu rozrodczego niż długość dnia świetlnego **(Cockrem 1995)**. Wysoka temperatura otoczenia jest jednym z najważniejszych stresorów powodującym

dotkliwe straty w produkcji drobiarskiej, w tym słabe przyrosty dobowe, immunosupresję, wysoką śmiertelność zwierząt, obniżoną wydolność układu rozrodczego **(Boni 2019)** oraz pogorszenie jakości uzyskiwanego mięsa **(Lin i in. 2006)**. Co ciekawe, na stres cieplny bardziej narażone są postmejotyczne stadia rozwojowe plemników to jest spermatogonia, spermatocyty i spermatydy. Plemniki dojrzewające w najądrzach są uważane za znacznie mniej podatne na uszkodzenia wywoływane wysoką temperaturą **(Rahman i in. 2018)**. Buhaje narażone na stres cieplny w okresie lata demonstrują zmniejszenie masy jąder i wahania w produkcji testosteronu **(Setchell 1998)** oraz zmniejszenie koncentracji plemników, ich ruchliwości, integralności ich plazmolemy oraz zwiększone występowanie mutacji DNA i nieprawidłowości morfologicznych w plemnikach **(Hansen 2009)**. Wykazano, że ostry stres cieplny (34°C) u kurcząt indukuje znaczną produkcję RFT i moduluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym SOD, CAT i GPx **(Yang i in. 2010)**. Wystąpienie zjawiska stresu cieplnego (32 ± 1°C) u kurcząt brojlerów wzmagało aktywność SOD i hamowało GPx w osoczu. Z kolei **Liu i inni (2014)** dowiedli, że stres cieplny obniża poziom GSH i hamuje aktywność GPx, SOD i CAT w surowicy u ptaków. Z drugiej strony zbyt niska temperatura otoczenia wywołuje dyskomfort ptaków i także może indukować zmiany w działaniu systemów antyoksydacyjnych. Dowiedziono, że brojlery wystawione na działanie chłodnego środowiska przez 3 tygodnie, wykazywały niższą aktywność SOD w osoczu krwi **(Pan i in. 2005)**.

W niniejszych badaniach zaobserwowano statystycznie wyższą zawartość białka całkowitego w plazmach nasienia indorów podczas okresu jesienno-zimowego, bez względu na barwę nasienia. Plazmy z tego okresu charakteryzowały się także wyższą aktywnością fosfatazy kwaśnej ($p \leq 0,05$) i dysmutazy ponadtlenkowej ($p \leq 0,01$), niższą aktywnością peroksydazy glutationowej i katalazy ($p \leq 0,01$) oraz niższą zawartością glutationu ($p \leq 0,01$). **Alvarez i inni (1987)** zaobserwowali, że aktywność SOD w plazmie nasienia jest dodatnio skorelowana z ruchliwością plemników. W plazmie nasienia tryków wyższą zawartość białka całkowitego notuje się podczas sezonu rozrodczego (to jest okresu pomiędzy październikiem a lutym) **(Marti i in. 2007)**. Podobną tendencję obserwuje się także w przypadku nasienia knurów **(Koziorowska-Gilun i in. 2011)**. Wspomniani autorzy wykazali także niższą aktywność GPx w plazmach nasienia knurów w okresie jesienno-zimowym. W odróżnieniu od naszych wyników aktywność SOD była niższa, a CAT wyższa podczas całego wyżej wymienionego okresu. **Nichi i inni (2006)** zaproponowali, że wyższa aktywność GPx w plazmie buhaja w sezonie letnim może być odpowiedzią na wyższe

poziomy generowanych wolnych rodników w nasieniu. U indorów najwyższą aktywność GPx zanotowano w plazmie nasienia żółtego właśnie podczas sezonu wiosenno-letniego. Według **Asadpoura i Tayefi-Nasrabadiego (2012)** aktywność CAT w plazmie nasienia buhajów jest o wiele wyższa jesienią ($p < 0,0001$) niż w pozostałych okresach roku. Natomiast aktywność GPx jest najniższa ($p < 0,01$) w zimie. Autorzy nie wykazali związku pomiędzy aktywnością SOD w plazmie a sezonem. W naszych badaniach omawianego związku również nie wykazano. System ochrony antyoksydacyjnej nasienia jest gatunkowo uwarunkowany. Jego wydolność zależy od funkcji jakie mają wypełniać poszczególne enzymy antyoksydacyjne, kompozycji i ilości kwasów tłuszczowych budujących błony komórkowe oraz zdolności do funkcjonowania plemników w warunkach aerobowych i/lub anaerobowych. Plemniki indora wykazują żywotność tylko w warunkach dostępu tlenu, więc potrzeba posiadania przez nie wystarczającej ochrony antyoksydacyjnej staje się nieodzowna. Wykazano, że enzymatyczny system antyoksydacyjny w nasieniu indora działa o wiele bardziej wydajnie niż w nasieniu koguta **(Santiago-Moreno i Blesbois 2020)**.

Niniejsze badania wykazały także wpływ sezonu na wybrane parametry ruchu plemników. Wykazano, że parametry VCL i BCF pozostawały wyższe, a parametry STR i LIN niższe w nasieniu z okresu jesienno-zimowego. Statystycznie wyższe ($p < 0,05$) wartości parametrów VCL oraz BCF notuje się w plemnikach ogiera w sezonie rozrodczym **(Suliman i in. 2020)**. Z kolei u samca osła najwyższe wartości parametrów VCL i BCF a najniższe LIN notuje się w okresie zimy **(Carluccio i in. 2013)**. Wspomniani autorzy tłumaczą to faktem przygotowywania się układu rozrodczego samca do sezonu rozrodczego, który rozpocznie się jak tylko zacznie się zwiększać długość dnia świetlnego. Korzystniejsze parametry ruchu plemników indorów w sezonie jesienno-zimowym można więc tłumaczyć wydajniejszą pracą ich układu rozrodczego w odpowiedzi na zwiększającą się długość dnia świetlnego. **Centola i Eberly (1999)** wykazali, że koncentracja plemników w ejakulacie jest najwyższa w zimie ($p = 0,004$), podczas gdy najwyższą ruchliwość plemników notuje się podczas jesieni i zimy ($p = 0,03$). W okresie jesienno-zimowym w ejakulatach indorów zaobserwowano także niższy odsetek plemników generujących tlenek azotu, proapoptotycznych oraz nekrotycznych. Mogło być to związane z niższym poziomem reaktywnych form wolno rodnikowych w nasieniu, co z kolei przejawiało się niższą aktywnością wybranych enzymów antyoksydacyjnych. Zarówno aktywność SOD jak i CAT były statystycznie niższe ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$) w wyżej wymienionym okresie. Wyniki naszych badań wskazały jednak na istnienie silnej dodatniej korelacji pomiędzy aktywnością

SOD w plemnikach indorów a ich ruchliwością w okresie wiosenno-letnim. Co ciekawe, zawartość glutationu w plemnikach była wyższa w okresie jesienno-zimowym. Może to wskazywać na lepsze zabezpieczenie systemu ochrony antyoksydacyjnej plemników indorów i jednoczesne mniejsze narażenie gamet na wystąpienie zjawiska stresu oksydacyjnego w tym czasie. Komponenty wewnątrzkomórkowego systemu GSH z reguły występują w niższych ilościach w ejakulatach o słabej jakości. Najprawdopodobniej niższa zawartość wewnątrzkomórkowego GSH jest związana z występowaniem nieprawidłowości morfologicznych w plemnikach. Toteż wystarczająca rezerwa glutationu w powiązaniu z aktywnością GPx jest niezbędna do eliminacji wolnych rodników, utrzymania przez plemniki żywotności oraz zdolności do przetrwania procesu kriokonserwacji **(Meseguer i in. 2007)**.

5.3. Znaczenie procesów fosforylacji/defosforylacji białek w fizjologii nasienia indora

Obecność wybranych białek w komórce, które uległy niewłaściwie przeprowadzonemu procesowi modyfikacji potranslacyjnej (PTM), powiązano z licznymi chorobami oraz zaburzeniami w dojrzewaniu komórek **(Wang i in. 2014)**. Wielu autorów wskazuje, że niektóre stany patologiczne związane z funkcjonowaniem męskiego układu rozrodczego, jak na przykład niemożność uzyskania przez plemniki ruchliwości, powstają w wyniku deregulacji procesów PTM w plemnikach. Większość badań opiera się na determinowaniu nasilenia fosforylacji reszt serynowych, treoninowych oraz tyrozylowych w białkach, czyli określenia stopnia tak zwanej fosforylacji kanonicznej. Jednak fosforylacji podlegają także inne reszty aminokwasowe. Aminokwasy takie jak histydyna, lizyna, arginina, kwas glutaminowy czy cysteina także mogą ulegać procesowi fosforylacji na drodze fosforylacji niekanonicznej **(Adam i Hunter 2018)**. Ogromna różnorodność profili fosforylacji białek mocno komplikuje poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, które z wyżej wymienionych fosforylacji wpływają na żywotność komórki **(Beltrao i in. 2013)**. Stąd poszukiwanie i wyjaśnianie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie balansu pomiędzy procesami fosforylacji a defosforylacji białek nasienia jest niezbędne dla określenia funkcjonowania układu rozrodczego **(Serrano i in. 2022)**. Zarówno rozwój struktur plemnika, jak i uzyskanie przez komórkę zdolności do ruchu, uzależnione są od ściśle skoordynowanego procesu fosforylacji wybranych białek ejakulatu.

Większość białek obecnych w plazmie nasienia białego ulegała zintensyfikowanej fosforylacji reszt tyrozylowych, natomiast żółtego reszt serylowo-treonylowych. Ponad 90% ufosforylowanych reszt białkowych w komórce to reszty fosfoseryny (pSer) lub fosfotreoniny (pThr), przy czym znaczna większość tych miejsc obejmuje reszty pSer. Swoista preferencja procesów fosforylacji reszt Ser nad Thr jest obserwowana w większości białek eukariotycznych. Jest ona wywołana zarówno rodzajem substratu, na który działają kinazy (szybsza fosforylacja Ser niż Thr) jak i aktywnością fosfataz (szybsza defosforylacja Thr niż Ser). Z drugiej strony większe ogólne indukowane zmiany strukturalne w białkach obserwuje się w przypadku fosforylacji treoniny niż w przypadku fosforylacji seryny. Ponieważ fosforylowanie reszt seryny nie wywołuje bezpośrednich zmian konformacyjnych w białku, podejrzewa się, że odgrywa ono dominującą rolę w procesach wymagających wielu następujących po sobie, stopniowych reakcji fosforylacji. Natomiast fosforylacja reszt Thr wywołuje znacznie bardziej złożone zmiany strukturalne w białku, które są wymagane dla osiągnięcia szybkich efektów funkcjonalnych poprzez włączanie lub wyłączanie specyficznych funkcji białka **(Pandey i in. 2020)**. Z kolei fosforylacja reszt tyrozyny służy do regulacji aktywności białek na wiele sposobów, w tym wywoływania odpychania elektrostatycznego i indukowania zmian powinowactwa chemicznego białka do cząsteczek. Jednak najważniejszą funkcją fosfotyrozyny jest służenie jako miejsce dokowania – promujące specyficzną interakcję między białkiem z ufosforylowaną tyrozyną a innym białkiem, które zawiera domenę wiążącą fosfotyrozynę. Omawiane specyficzne interakcje pomiędzy białkami są niezbędne do transdukcji sygnału od receptorowych kinaz tyrozynowych, zlokalizowanych na powierzchni w głąb komórki. Działanie wyżej wymienionych kinaz aktywuje wiązanie odpowiedniego ligandu zewnątrzkomórkowego, a w konsekwencji wywołuje określoną odpowiedź komórkową **(Hunter 2014)**. Silniejsza ekspresja reszt fosfotyrozynowych w plazmie nasienia białego indora może wskazywać na ich udział w nabywaniu przez plemniki zdolności do transdukcji sygnału, przygotowaniu gamet do przejścia kolejnych etapów ich aktywacji i zapłodnienia komórki jajowej. Z drugiej strony nasilona fosforylacja reszt serylowych i treonylowych w żółtych plazmach nasienia może wskazywać na proces reorganizacji ich proteomu i ustalania jego ostatecznego składu.

Proteomika porównawcza pozwoliła na wyłonienie potencjalnych biomarkerów plazmy nasienia, których zawartości i/lub aktywności wzrastają lub spadają podczas trwania wybranych stanów patologicznych układu rozrodczego na przykład: bezpłodności,

azoospermii, astenozoospermii czy niepłodności indukowanej stresem oksydacyjnym **(Samanta i in. 2018)**. Białka plazmy nasienia są niezbędne dla właściwego funkcjonowania plemników a zwłaszcza ich interakcji z różnymi odcinkami układu rozrodczego, a następnie osłoną przejrzystą komórki jajowej. Ponadto, specyficzne peptydy i białka pełnią rolę sygnałów dla układu odpornościowego samicy. Istnieje przypuszczenie, że mogą one modulować samoistną niepłodność samca i/lub pary **(Rodríguez-Martínez i in. 2011)**. Cechą charakterystyczną budowy układu rozrodczego samców ptaków jest nieobecność dodatkowych gruczołów płciowych. Rolą wyżej wymienionych gruczołów u ssaków jest wytwarzanie płynów wchodzących w skład ejakulowanego nasienia. Stąd ich brak w układach rozrodczych ptaków wpływa na ostateczną objętość ejakulatu, która w przypadku indora jest bardzo mała i zwykle nie przekracza objętości 1 ml. Ponadto, brak występowania dodatkowych gruczołów płciowych u indorów warunkuje specyficzność składu plazmy nasienia indorów. Literatura podaje, że plazmę w największym stopniu stanowi wydzielina zredukowanych najądrzy oraz nasieniowodów. Jednak w jej składzie mogą pojawiać się także komponenty przechodzące bezpośrednio z krwi **(Chełmońska i Kassner, 2007)**. Niektóre białka występujące w wysokich ilościach w proteomie nasienia wróbla pochodzą właśnie z wydzielin najądrzy. Są to alfa-enolaza (ENO1), kinaza pirogronianowa (PKM), izomeraza triozofosforanowa (TPI1), kinaza fosfoglicerynianowa (PGK1) oraz kinaza keratynowa typu B (CKB) **(Rowe i in. 2020)**. Z kolei głównymi składowymi płynu wydzielniczego nasieniowodów większości gatunków są semenogelina I i II, które najpierw zaangażowane są w żelowanie ostatnich frakcji nasienia a następnie ich upłynnianie. Produkty, które powstają w wyniku tego procesu wpływają na zahamowanie ruchu plemników oraz antybakteryjną aktywność wybranych białek plazmy nasienia takich jak laktoferyny, fibronektyny czy inhibitora białka C **(Duncan i in. 2007)**. Spora liczba białek wydzielanych zewnątrzkomórkowo (ECM), a obecnych w plazmie nasienia, występuje w postaci ufosforylowanej. Jednak niewiele wiadomo na temat wpływu ich fosforylacji na fizjologię zawieszonych w niej plemników. Liczne badania z wykorzystaniem spektrometrii mas wykazały, że znaczna część białek ECM takich jak na przykład witronektyna, laminina-1, osteopontyna, sjaloproteina, kolagen czy fibronektyna może występować w ufosforylowanych formach **(Yalak i in. 2019)**. Fibronektyna posiada domeny wiążące inne białka, w tym kolagen, fibrynę, heparynę, DNA i aktynę. **Martin i Ekman (1986)** wykazali, że fosforylacja albuminy obecnej w plazmie zależy od miejsca pochodzenia białka jak i gatunku zwierzęcia. Gen albuminy surowicy (ALB) koduje białko osocza krwi biorące udział w swoistych reakcjach odpornościowych **(Giles i Czuprynski**

2003). U indyków domowych dodanie albuminy surowicy do medium w warunkach *in vitro* wydaje się zwiększać odsetek plemników ruchliwych oraz prędkość ich ruchu **(Atikuzzaman i in. 2017) (Rowe i in. 2020)**. **Visconti i inni (2002)** zaobserwowali zależność pomiędzy zawartością albuminy w medium a nasileniem procesu fosforylacji reszt tyrozynowych przechowywanych plemników. Zasugerowali oni istnienie korelacji pomiędzy wypływem cholesterolu z plazmolemy, powodowanym działaniem albuminy, a fosforylacją wyżej wymienionych reszt w plemnikach indukowaną przez cAMP. Z kolei **Terazaki i inni (1998)** zaobserwowali, że zwiększona zawartość ufosforylowanej formy transtyretyny w plazmie nasienia szczura może pośrednio wskazywać na toczący się w układzie rozrodczym proces zapalny. Fosforylacja innych białek ECM, takich jak na przykład owotransferyna, może z kolei zmieniać strukturę białka, a tym samym wpływać na zwiększenie jego termostabilności oraz jego właściwości emulgujące **(Wang i in. 2021c)**. Owotransferyna, zaraz po albuminie, jest białkiem występującym w wysokich ilościach w plazmie nasienia koguta i indora **(Marzoni in. 2013; Słowińska i in. 2017)**. W żółtku jaja wykazuje ona aktywność bakteriobójczą. Przypuszcza się, że podobne działanie wykazuje w plazmie nasienia samca. Owotransferyna naturalnie nie występuje w nasieniu ssaków, dlatego podejrzewa się, że jej wysokie ilości w układach rozrodczych ptaków odpowiedzialne są za utrzymanie specyficznej odporności układów oraz ochronę ich wydzielin przed patogenami **(Santiago-Moreno i Blesbois 2020)**. W niniejszej pracy dowiedziono, że albumina, owotransferyna, fibronektyna, transtyretyna, łańcuchy kolagenu oraz immunoglobulin obecne w plazmie nasienia indora podlegają złożonym reakcjom fosforylacji. Ponadto wykazano zróżnicowany stopnień ich ufosforylowania. Fosforylacja specyficznych reszt aminokwasowych może mieć też wpływ na aktywność biologiczną wybranych białek. Ich obecność niemal w każdym prążku otrzymanym po elektroforezie i poddanemu identyfikacji można tłumaczyć ogromną ilością omawianych polipeptydów w nasieniu indora.

Z kolei fosforylacja białek plemnika warunkuje zajście prawidłowego procesu spermatogenezy, nabycia przez plemniki ruchliwości oraz kapacytacji co ostatecznie wpływa na jakość ejakulatu. Badania dotyczące fosfoproteomu plemników różnych gatunków zwierząt wykazały, że fosforegulacja determinuje także proces formowania plemnika i jego dojrzewania **(Serrano i in. 2022)**. Proces fosforylacji reszt tyrozynowych białek plemnikowych determinuje zajście procesu kapacytacji gamet, a następnie zapłodnienia komórki jajowej. Mimo, że plemniki pochodzące z ejakulatów różnej jakości

wykazują zróżnicowaną zdolność zapładniającą, to związek pomiędzy stopniem fosforylacji reszt tyrozylowych białek a ich funkcjonalnością oraz jakością nadal pozostaje niejasny **(Buffone i in. 2004)**. Ufosforylowane reszty serylowe i treonylowe biorą udział nie tylko w regulacji ruchliwości plemników, ale także procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie komórek oraz fałdowanie białek **(Jha i in. 2006)**. Obecność w plemnikach indorów reszt fosforylowanych głównie na resztach seryny i tyrozyny może mieć znaczenie w rozwoju aktywności danego białka. Zmiany te mogą mieć fizjologiczne znaczenie w przygotowaniu niektórych fosforylowanych białek do pełnienia określonych funkcji. W komórkach somatycznych fosforylacja kinazy 3 syntazy glikogenowej (GSK-3) na resztach tyrozynowych i serynowych jest niezbędna do rozpoczęcia działania przez enzym. Fosforylacja reszt seryny w GSK-3 znacznie nasila się podczas pasażu plemników przez najądrza i wpływa na nabycie przez gamety zdolności do ruchu. Plemniki pochodzące z ogona najądrzy wykazują silniejszą ekspresję fosfoprotein serynowych w porównaniu z plemnikami pochodzącymi z głowy najądrzy. Jednak GSK-3α w plemnikach z ogona miała większą masę cząsteczkową niż w plemnikach z głowy. Autorzy zasugerowali, że GSK-3α w plemnikach pochodzących z głowy może być fosforylowana albo na resztach seryny albo tyrozyny, podczas gdy w plemnikach z ogona enzym może być fosforylowany na obu resztach **(Somanath i in. 2013)**. Może to wskazywać na zasadność fosforylowania obu rodzajów reszt aminokwasowych białek plemników z nasienia białego indora w celu ich aktywacji.

Jak dotąd wyróżniono wiele fosfoprotein związanych z uzyskaniem przez plemniki zdolności do ruchu, w tym białka aksonemy. Subpopulacje gamet prezentujących słabą zdolność zapładniającą charakteryzowały się hiperaktywnym ruchem oraz zbyt szybkim podleganiem procesom kapacytacji i reakcji akrosomowej. Wszystko spowodowane było niewłaściwym przejściem procesu fosforylacji białek plemnikowych **(Visconti i in. 1998)**. Literatura podaje, że plemniki prezentujące wysoką i niską ruchliwość wykazują różne stopnie ufosforylowania wybranych białek. Zastosowanie elektroforezy 2D pozwoliło na zidentyfikowanie 12 polipeptydów wykazujących różne stopnie ufosforylowania, które następnie skorelowano ze zmianami ruchliwości plemników. Fosforylacja białek wzrasta podczas procesu kapacytacji i jest uważana za niezbędną do zapłodnienia komórki jajowej przez plemniki u wielu gatunków. Hiperaktywowana ruchliwość, która jest wymagana, aby plemniki mogły penetrować wzgórek jajonośny i osłonę przejrzystą oocytu, jest głównie związana z fosforylacją reszt tyrozynowych zlokalizowanych w główce plemników. Zatem

osiągnięcie progu ufosforylowania reszt tyrozynowych w plemnikach może być związane z nabyciem przez plemniki zdolności do hiperaktywnego ruchu **(Chan i in. 2009)**. W omawianej pracy zaobserwowano znaczną liczbę białek plemnikowych podlegających ufosforylowaniu. Najwięcej z nich podlegało fosforylacji na resztach serynowych oraz tyrozynowych. Proces ten może być aktywowany przez prolinę u myszy **(Jha et al. 2006)**. Z drugiej strony fosforylacja reszt seryny i/lub treoniny plemników knura zachodzi głównie na wczesnym etapie kapacytacji i jest to proces katalizowany przez kinazę białkową A (PKA), co wskazuje, że aktywacja kinaz serynowo/treoninowych następuje przed fosforylacją tyrozyny **(Naz 1999)**. Co ciekawe, profile fosforylacji reszt serynowych i tyrozynowych nasienia indora były zbieżne. Może to wskazywać na konieczność dołączenia przez białka fosforu zarówno na resztach seryny jak i tyrozyny w celu uzyskania przez nie pełnej aktywności biologicznej. Zaobserwowano wyższy stopień nasilenia fosforylacji białek w plemnikach pochodzących z nasienia żółtego oraz pobranego w okresie wiosenno-letnim, co może wskazywać na istotę tych procesów w nabyciu przez plemniki zdolności zapładniającej, ale i skuteczniejszej ochrony gamet w okresie narażonym na działanie wyższych temperatur.

5.4. Rola wybranych zidentyfikowanych fosfoprotein w fizjologii nasienia indora

W niniejszej pracy zidentyfikowano łącznie 142 fosfoproteiny występujące w plazmie i plemnikach indorów. Wskazane fosfoproteiny plazmy nasienia uczestniczą przede wszystkim w procesach zapłodnienia komórki jajowej, organizacji i mechanizmie działania cytoszkieletu aktynowego, regulacji transportu i ustalaniu ostatecznego składu proteomu odpowiednich przedziałów komórkowych. Natomiast fosfoproteiny plemników biorą udział w generowaniu ATP, metabolizmie węglowodanów oraz zapłodnieniu. Fosfoproteomika (HPLC-MS/MS triple TOF) porównawcza plemników prezentujących zróżnicowaną ruchliwość zidentyfikowała 210 fosfopeptydów odpowiadających 119 białkom. Analiza wykazała, że w plemnikach o niskiej ruchliwości 40% z nich jest zaangażowanych w metabolizm (katabolizm, transport białek, biosyntezę lipidów), 25% w spermatogenezę i funkcje plemników, 8% w odpowiedź układu odpornościowego i 6% w naprawę DNA. Natomiast w plemnikach o wysokiej ruchliwości 48% fosfoprotein jest związanych ze spermatogenezą i funkcją plemników (przede wszystkim ich ruchliwością), podczas gdy tylko 8% jest związanych z metabolizmem **(Martin-Hidalgo i in. 2020)**.

W omawianych badaniach wykazano, że główną rolą fosfoprotein plemników indorów jest generowanie zapasów ATP w celu utrzymania ruchliwości niezbędnej do przebycia układu rozrodczego samicy i zapłodnienia komórki jajowej. Dlatego w nasieniu omawianego gatunku obecność wielu białek zaangażowanych w dojrzewanie plemników, ewentualne usuwanie nieprawidłowych gamet oraz rozwój aparatu ruchu plemników wskazuje na wagę powstawania prawidłowo uformowanych i ruchliwych gamet. Jak wiadomo ruchliwość plemników indora wpływa nie tylko na rodzaj kontaktu plemników z białkami układu rozrodczego samicy oraz ich przechowywanie w układzie rozrodczym samicy, ale i późniejszy wskaźnik zapładnialności jaj.

Okazuje się, że fosfoproteiny zidentyfikowane w nasieniu indora występują także w ufosforylowanej postaci w nasieniu wielu gatunków ssaków, w tym człowieka. Część z nich, w dostępnej literaturze, została określona jako potencjalne biomarkery jakości ejakulatu i/lub zdolności zapładniającej plemników. Wśród nich znajdowały się zarówno białka uczestniczące w procesie dojrzewania plemników, odpowiedzialne za wykształcenie odpowiednio pracującego aparatu ruchu plemników, prowadzenie wydajnego metabolizmu komórkowego, skuteczną ochronę przed stresem oksydacyjnym, ale i poprawnie przeprowadzony proces zapłodnienia komórki jajowej. W nasieniu indora zidentyfikowano fosfoproteiny będące produktami ekspresji między innymi takich genów jak: UBB, RPS27A, SPATA18, CDC42, ACTN, TBB, ACTA, ODF2, GAPDH, PGAM, PGK, TPI, ALDOC, LDH, SDHA, FASN, APOA, CKM, GOT, CA, CALM, TRFC, FTH, HSPA, HSP, GST, PRDX, QSOX, ASTL, ANXA, ACR, GSN, VDAC oraz PLCZ1.

Podczas dojrzewania plemników w najądrzach, oprócz fosforylacji, zachodzi także ubikwitynacja białek. Omawiana zmiana potranslacyjna pełni kluczową rolę w wielu biologicznych procesach, ponieważ eliminuje wadliwe plemniki (głównie te z defektami morfologicznymi) poprzez fagocytozę **(Sutovsky i in. 2001)**. Ubikwitynacyjny system degradacji właściwej jest ponadto zaangażowany w cykl tworzenia gamet podczas dwóch pierwszych faz spermatogenezy oraz remodelowania haploidalnych spermatyd. Ubikwitynacja jest również kluczowa podczas procesu zastępowania histonów przez protaminy podczas etapu spermiogenezy **(Richburg i in. 2014)**. Białka, związane z procesami degradacji w szlaku ubikwitynacji białek, takie jak ligazy ubikwitynowe to jest UBR4 i HUWE1, poliubikwityna (UBB) oraz rybosomalne białka ubikwityny-40S takie jak rybonukleoproteiny S27a i RPS27A okazały się hiperfosforylowane w plemnikach o niskiej ruchliwości. Ponadto białka pokrewne Ras, takie jak RAB2A, RAB2B lub RAB4A,

które biorą udział w transporcie pęcherzykowym, oraz białka rybosomalne, takie jak RPLP2, RPL15 lub DAP3, zaangażowane w metabolizm białek, również wykazywały zróżnicowaną fosforylację białek **(Parte i in. 2012)**. Rodzina białek RAB nie tylko reguluje różne etapy transportu pęcherzykowego, ale i ułatwia wiązanie białek cytoszkieletu z błonami plazmatycznymi plemników **(Bae i in. 2019)**. W omawianej pracy w nasieniu indora wykazano obecność poliubikwityny oraz białka RPS27A, które najprawdopodobniej biorą udział w apoptozie wadliwych i/lub morfologicznie nieprawidłowych czy niewłaściwie funkcjonujących plemników. Ponadto zidentyfikowano kilka czynników RAB to jest RAB2, RAB5, RAB10, zwłaszcza w plazmie nasienia indora, których obecność można tłumaczyć udziałem w organizacji i aktywowaniu aparatu ruchu plemników.

Proteasom odgrywa kluczową rolę w tworzeniu ukształtowanych plemników, ponieważ pośredniczy w degradacji białek ubikwitynowanych podczas spermatogenezy. Dlatego ewentualne defekty w działaniu proteasomu mogą prowadzić do gromadzenia się ubikwitynowanych cząsteczek i być związane z upośledzeniem ruchliwości plemników **(Siva i in. 2010)**. Ponadto wykazano, że poziomy ekspresji SEMG1 i PSMB5 są regulowane „w dół" w porównawczym badaniu proteomów męskich plemników, które dały wysoki lub niski wskaźnik zapłodnień technikami wspomaganego rozrodu – ART **(Serrano i in. 2022)**. W niniejszej pracy wykazano występowanie fragmentów PSMB5 wśród fosfoprotein zidentyfikowanych w plazmie nasienia indorów. Ekspresja PSMB5 może służyć jako potencjalny wskaźnik stopnia fragmentacji DNA plemników **(Intasqui i in. 2016)**. Zwiększoną fosforylację omawianego komponentu w nasieniu indora można tłumaczyć znaczną liczbą uszkodzonych plemników w ejakulacie.

Niskie poziomy ekspresji głównych składników cytoszkieletu w witkach plemników, takich jak tektyny (TEK1, TEK4 i TEK5), białka zewnętrznych włókien gęstych (ODF2) lub tubuliny (TUBB2C, TUBB2B i TUBA3C) są związane ze zmniejszoną ruchliwością plemników **(Serrano i in. 2022)**. α i β tubuliny plemników podlegają wielu potranslacyjnym modyfikacjom, w tym acetylacji, palmitylacji, fosforylacji reszt tyrozynowych oraz poliglutamylacji **(Inaba 2003)**. Wszystkie wymienione modyfikacje odgrywają rolę w stabilizacji mikrotubul i białek towarzyszących oraz wpływają na ruch witki plemnika **(Audebert i in. 1999)**. **Słowińska i inni (2020)** wykazali obecność transkryptów białek odpowiedzialnych za fosforylację tubuliny tj. kinazy-2 tubuliny tau w jądrach indyków. Wśród zidentyfikowanych fosfoprotein nasienia indora wykazano obecność zarówno ODF

jak i białek tubuliny. Stopień ich ufosforylowania wydaje się mieć związek z nabywaniem przez plemniki indora zdolności do ruchu.

W niniejszej pracy przy użyciu metody spektrometrycznych zidentyfikowano także wiele izoform aktyny, białek wiążących aktynę oraz białek zaangażowanych w proces polimeryzacji/depolimeryzacji aktyny między innymi GTPazy Rho, białka czapeczkujące, gelsolinę oraz miozynę. Aktyna jest białkiem cytoszkieletu biorącym bezpośredni udział w nabywaniu przez plemniki zdolności do ruchu progresywnego, hiperaktywacji ruchu oraz egzocytozy akrosomu u ssaków. Co więcej, zasugerowano, że białka wiążące aktynę, w szczególności białka motoryczne, odgrywają istotną rolę w spermatogenezie **(Wang i in. 2021a)**. Proces polimeryzacji/depolimeryzacji aktyny zachodzi podczas kapacytacji plemników, a depolaryzacja F-aktyny jest niezbędna do hiperaktywacji męskich komórek rozrodczych **(Breitbart i Finkelstein, 2018)**. Główną funkcją białek Rho CDC42 i RhoA jest kierowanie polimeryzacją aktyny. Chociaż te dwa białka Rho są obecne w plemnikach ssaków, niewiele wiadomo na temat ich roli w kapacytacji, reakcji akrosomowej i sposobu, w jaki kierują polimeryzacją aktyny. Wyniki badań wskazują, że hamowanie ekspresji CDC42 i RhoA zmienia kinetykę polimeryzacji aktyny, kapacytacji i reakcji akrosomowej na różne sposoby. Ponadto wykazano, że inicjacja polimeryzacji aktyny i aktywacja RhoA zależy od aktywacji CDC42, i że RhoA rozpoczyna wykazywać aktywność i wpływ na polimeryzację aktyny, gdy CDC42 osiąga maksymalną ekspresję **(Reyes-Miguel i in. 2020)**. Obecność ufosforylowanych form GTPaz, aktyn oraz CDC42 wskazuje na ich udział w formowaniu cytoszkieletu i aktywacji ruchu plemników indorów.

Czternaście białek o różnej ekspresji i o zróżnicowanej fosforylacji odgrywa kluczową rolę w rozwoju i ruchliwości witki w plemnikach knurów, a zwłaszcza białka ODF1, SMCP, AKAP4, FSIP2 i SUN5. Z kolei fosforylacja białek swoistych dla plemników, takich jak CABYR, ROPN1, CALM1, PRKAR2A i PRKAR1A, bierze udział w regulacji ruchliwości plemników knurów. Dzieje się to głównie poprzez szlak sygnałowy cAMP/PKA wykazując, że fosforylacja białek może być ważnym mechanizmem leżącym u podstaw rozwoju i różnicowania ruchliwości gamet **(Xu i in. 2021)**. Obecność zarówno ODF jak i CALM w nasieniu indorów może wskazywać na ogromną złożoność i kompleksowość działania mechanizmu odpowiedzialnego za rozwój ruchu plemników.

HSP wykazują potencjalny związek z jakością nasienia, gdyż są niezbędne w prawidłowej fizjologii, spermatogenezie i dojrzewaniu plemników **(Dun i in. 2012)**.

Nadrzędną rolą HSP jest kontrolowanie procesu prawidłowego fałdowania białek, ich ponownego fałdowania w przypadku nieprawidłowo ukształtowanych polipeptydów oraz kontrola ukierunkowywania znakowanych białek w celu ich późniejszej degradacji. Stąd zmniejszona ekspresja HSP może być związana ze spadkiem ruchliwości plemników z powodu nagromadzenia nieprawidłowo sfałdowanych białek **(Bracke i in. 2018)**. Białka te często są produkowane w odpowiedzi na stres komórkowy, a podwyższona ekspresja jest prawdopodobnie spowodowana ich rolą ochronną w naprawie uszkodzeń spowodowanych stresem cieplnym **(Pei i in. 2012)**. W momencie, gdy komórki są poddawane działaniu stresora jakim jest wysoka temperatura, HSP70 zwiększa aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), chroniąc ją przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. HSP70 reguluje aktywność SOD w celu ochrony błon plazmatycznych plemników przed RFT. Wyniki badań sugerują, że HSP70-2 może brać udział w dostosowywaniu granic termotolerancji plemników do ostrych lub przewlekłych zmian temperaturowych (to jest środowiskowych lub związanych z technologią nasienia) **(Rosyada i in. 2022)**. Ponadto wykazano, że białka szoku cieplnego, HSPB1 i HSP90A, podlegają zróżnicowanej fosforylacji w subpopulacjach plemników prezentujących wysoką i niską ruchliwość **(Martin-Hidalgo i in. 2020)**. W nasieniu indora zidentyfikowano HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSP70 oraz HSP90 które najprawdopodobniej odgrywają rolę chaperonów wobec nowo formowanych białek plemników. Ich nadmierną ekspresję w nasieniu indora można tłumaczyć większym zapotrzebowaniem gamet na ochronę swoich struktur przed skutkami zmieniającego się środowiska zewnętrznego. Fosforylacja omawianych białek może więc wpływać na ich aktywność biologiczną lub ich powinowactwo do plemników.

ANXA2 jest białkiem wiążącym i regulującym poziom jonów wapnia. Aneksyna A2 występuje głównie w egzosomach i jest zaangażowana w ich ukierunkowywanie i fuzję. Nieprawidłowa ekspresja ANXA2 może prowadzić do uszkodzenia mechanizmu fuzji egzosomów, upośledzając przenoszenie elementów egzosomów do komórek i skutkując produkcją niedojrzałych plemników **(Cakan i in. 2008)**. Potwierdzają to badania **Munuce i innych (2019)** w których stwierdzono niższe zawartości ANXA1 i A2 przy jednoczesnych wyższych poziomach ich mRNA w próbach nasienia słabej jakości. Obecność obu wyżej wymienionych polipeptydów stwierdzono wśród fosfoprotein plazmy nasienia indorów.

Stopień nasilenia fosforylacji wybranych białek nasienia indora może mieć związek ze statusem fizjologicznym zawieszonych w nim plemników. Wykazano, że białka VDAC2, HSP 70, HSP 90α, białko czapeczkujące F-aktynę, ODF oraz α-tubulina podlegają nasilonej

fosforylacji reszt tyrozynowych w plemnikach podczas kapacytacji **(Ficarro i in. 2003)**. **Fu i inni (2019)** wykorzystując MS i akwizycję niezależną od danych (DIA), zidentyfikowali 174 białka których ekspresja ulegała rozregulowaniu podczas kriokonserwacji nasienia mężczyzny. Były wśród nich cztery enzymy zaangażowane w glikolizę (GPI, LDHB, ADH5 i PGAM1) oraz białka związane między innymi z metabolizmem propionianu, glioksylanu, pirogronianu i dikarboksylanu oraz glukoneogenezą. Ponadto obie izoformy mutazy fosfoglicerynianowej (PGAM1 i PGAM2) oraz izomerazy glukozo-6-fosforanowej (GPI), również ulegają zmniejszonej ekspresji w plemnikach o obniżonej ruchliwości **(Guo i in. 2019)**. Co więcej, wyższy poziom izomerazy triozofosforanowej (TPI), niezwykle wydajnego enzymu metabolicznego w glikolizie i glukoneogenezie, jest związany ze zmniejszoną ruchliwością plemników. Inne fosfoproteiny biorące udział w metabolizmie węglowodanów i wytwarzaniu energii, takie jak aldolaza fruktozo-bisfosforanowa A (ALDOA), dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (GAPDH) czy izomeraza mannozo-6-fosforanowa (MPI) również wykazują zróżnicowane profile fosforylacji w subpopulacjach męskich plemników o bardzo różnych stopniach ruchliwości. MPI była hipofosforylowana w plemnikach o słabej ruchliwości, podczas gdy stopień nasilenia fosforylacji ALDOA i GAPDH był wyższy **(Parte i in. 2012)**. W rzeczywistości do 40% ludzkich białek, które są hiperfosforylowane w plemnikach o niskiej ruchliwości, bierze udział w metabolizmie. Część z tych białek zaobserwowano wśród fosfoprotein nasienia indora. Zróżnicowane stopnie ich ufosforylowania mogą wpływać na włączenie lub nie ich funkcji biologicznych, a to z kolei na poprawnie zachodzący metabolizm plemników.

Właściwy skład lipidowy błony plazmatycznej plemników jest niezbędny do zachowania przez plemniki funkcjonalności i integralności ich plazmolemy. Wybrane typy lipidów biorą udział w każdym kluczowym etapie procesu zapłodnienia komórki jajowej. Metabolizm lipidów musi podlegać ścisłej regulacji, gdyż zapewnia on właściwe zajście fizjologicznych procesów w plemnikach takich jak nabycie przez nie ruchliwości, przejście kapacytacji, reakcji akrosomowej oraz procesu fuzji plemnika z komórką jajową. Jednocześnie wykazano, że zdolność zapładniająca w dużej mierze zależy od utrzymania homeostazy lipidów błonowych przez plemniki **(Shan i in. 2021)**. Stwierdzono, że na przykład zbyt niska aktywność FASN w plemnikach wpływa na zwiększenie stopnia fragmentacji ich DNA, natomiast ponadnormatywną ekspresję omawianego enzymu w nasieniu powiązano z przypadkami utraty wczesnej ciąży **(Finelli i in. 2021)**. Na fragmentację DNA może także wpłynąć nadmierna ekspresja kinazy fosfoglicerynianowej

(PGK), białka zewnętrznych włókien gęstych (ODF), klusteryny (CLU), białka aniono i napięciozależnego kanału jonowego (VDAC2) oraz białka wiążącego osłonę przejrzystą (ZPBP), które wskazano jako potencjalne biomarkery jakości nasienia **(Intasqui i in. 2013a)**. Wszystkie z wymienionych zostały zidentyfikowane w nasieniu indora i występowały w ufosforylowanej formie.

5.5. Wpływ rodzaju ejakulatu na profil ufosforylowania białek nasienia

W niniejszej pracy wykazano istnienie dodatnich ($p < 0,05$) korelacji pomiędzy zawartością białka a aktywnością fosfatazy alkalicznej (ALP) w białych oraz fosfataz kwaśnej (ACP) i alkalicznej (ALP) w żółtych plazmach nasienia. Wyniki naszych badań są częściowo zgodne z wynikami **Hessa i Thurstona (1984)**, którzy wykazali, że wyższej zawartości białka w żółtych plazmach nasienia towarzyszy wzrost aktywności ACP. W naszych badaniach aktywność ACP i ALP była niemal lub ponad dwukrotnie wyższa (odpowiednio $p < 0,05$ i $p < 0,01$) w nasieniu żółtym w porównaniu z nasieniem białym. Z drugiej strony **Słowińska i inni (2015)** zasugerowali, że wzrost aktywności omawianych enzymów nie jest proporcjonalny do wzrostu zawartości białka całkowitego i w rzeczywistości poziom aktywności wyżej wymienionych enzymów jest niższy w nasieniu żółtym niż w nasieniu białym. Wyniki naszych badań wskazały na inną tendencję i jednocześnie wykazały negatywną zależność pomiędzy wzrostem aktywności ALP i ACP w plazmie a całkowitą ruchliwością plemników ($p < 0,05$). Jest to sprzeczne z wynikami badań **Ďuračka i innych (2023)** w których zaobserwowano, że spadek aktywności ALP w plazmie nasienia koguta jest charakterystyczny dla ejakulatu o niższym odsetku plemników poruszających się progresywnie. Z kolei **Henricks i inni (1998)** wykazali, że aktywność ALP jest dodatnio skorelowana z odsetkiem plemników nieruchliwych w nasieniu knurów. Omawiane różnice mogą być spowodowane gatunkowo uwarunkowanym składem plazm nasienia i różnie manifestowaną aktywnością omawianych enzymów we wspomnianym płynie.

Los komórek jest zależny od ich interakcji z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM). ECM podlega ciągłej przebudowie, zaaranżowanej przez syntezę i wydzielanie konkretnych białek, a także poprzez degradację wybranych przez określone enzymy na przykład metaloproteinazy. Dynamika zmian ECM może wpływać na właściwości biochemiczne i mechanofizyczne występujących komórek **(Lin i in. 2019)**. Obecność niektórych z białek

można powiązać z rozwojem ECM. Tak jest w przypadku PPIB czy SPARC, których ufosforylowane formy zaobserwowano w niniejszej pracy. Zarówno konformacja jak i aktywność wielu białek fosforylowanych na resztach seryny i treoniny są regulowane poprzez izomeryzację fosforylowanych wiązań Ser/Thr-Pro. Peptydylo-prolyl cis/trans izomeraza B (PPIB) katalizuje izomeryzację cis/trans wiązań peptydylo-prolylowych peptydów, poprzedzoną ufosforylowaniem reszt seryny lub treoniny. Ulega ona intensywnej ekspresji w komórkach Sertoliego, a „wyłączenie" genu PPIB wskazuje na zaburzenie działania bariery krew-jądro **(Islam i in. 2017)**. Zaobserwowano silniejszą fosforylację omawianego białka w nasieniu białym. SPARC należy do rodziny białek oddziałujących z macierzą komórki i modulujących adhezję komórkową. Jest białkiem o wysoce zakonserwowanej strukturze występującym w nasieniu wielu gatunków ssaków **(Brekken i Sage 2001)**. SPARC wykazuje działanie antyadhezyjne między innymi poprzez rozszczepianie powstałych kompleksów adhezyjnych i reorganizację włókien naprężeniowych aktyny. Przeciwadhezyjny wpływ SPARC na komórki śródbłonka jest realizowany przez szlak zależny od fosforylacji reszt tyrozyny **(Yan i Sage 1999)**. Polipeptyd jest produktem działalności wydzielniczej najądrzy. Udowodniono, że płyn najądrzy stekowców jest zdominowany przez grupę białek w której SPARC stanowi aż około 8% ich zawartości. Struktura omawianego białka, bogata w reszty cysteiny, sugeruje, że może ono wspomagać rozwój aparatu ruchu plemników poprzez tworzenie usieciowanej struktury wewnątrzcząsteczkowej, stabilizowanej przez wiązania disiarczkowe. Potwierdzono to zidentyfikowaniem białka podobnego do SPARC w ekstraktach plemników dziobaka rozdzielonych w warunkach redukujących. Co ciekawe, w ekstraktach pozbawionych detergentu omawianego białka nie stwierdzono **(Nixon i in. 2016)**. SPARC jest kodowany przez pojedynczy gen u wszystkich gatunków badanych do tej pory **(Mason i in. 1986)**. Chociaż SPARC (po odcięciu sekwencji sygnałowej) jest białkiem o masie 32 kDa, forma ulegająca sekrecji ma masę nawet 43 kDa (SDS-PAGE). Dzieje się to poprzez dodanie reszty glikoproteinowej do pierwotnej struktury (**Sage i in. 1984**). Obecność białka SPARC wykazano także w plazmie nasienia indora. Jego występowanie w kilku prążkach poddanych identyfikacji zdaje się potwierdzać obecność zarówno reszty glikozydowej jak i wielu wiązań disiarczkowych w jego budowie i możliwość rozpadania się białka na pochodne o różnych masach cząsteczkowych. Zaobserwowano jego silniejszą fosforylację w plazmie nasienia białego oraz sezonie jesienno-zimowym, co może wskazywać na rolę omawianego białka w formowaniu i kształtowaniu aparatu ruchu, a następnie nabywaniu przez plemniki zdolności do poruszania się.

Rodzaj nasienia najprawdopodobniej warunkował też nasilenie ufosforylowania fosfoproteiny o masie cząsteczkowej około 106 kDa. Syntaza kwasów tłuszczowych (FASN) występuje u indora jako dimer o masach cząsteczkowych zbliżonych do 250 kDa. Każdy z dimerów posiada trzy funkcjonalne domeny tj. domenę I zawierającą transacylazę acetylową i malonylową (127 000 Da), domenę II zawierającą dehydratazę, reduktazę β-ketoacylową i reduktazę enoliową (107 000 Da) oraz domenę III zawierającą tioesterazę (33 kDa) **(Yuan i in. 1988)**. Aktywność FASN bazuje na zawartości NADPH oraz acetylo-CoA w komórce i jednocześnie aktywuje zależne od dehydrogenazy izocytrynianowej 1 (IDH1) procesy redukcyjnej karboksylacji. Mechanizm ten zapewnia ciągłą produkcję zredukowanych równoważników w celu bilansowania skutków mitochondrialnego stresu oksydacyjnego i ograniczenia apoptozy komórek. Co ciekawe fosforylacja reszt tyrozyny w FASN ma kluczowe znaczenie dla utrzymania jej aktywności biologicznej w pewnych typach komórek **(Schroeder i in. 2021)**. Stąd, można wnioskować, że fosforylacja FASN w nasieniu indora jest kluczowa dla zajścia procesów metabolizmu kwasów tłuszczowych. Co ciekawe, FASN jest uważana za biomarker fluktuujący pomiędzy środowiskiem a wnętrzem komórki, ponieważ gdy jej ekspresja wzrasta ponadnormatywnie w płynie zewnątrzkomórkowym dochodzi do równoczesnego spadku lub wyczerpywania jej aktywności wewnątrz komórki **(Fernandez-Real i in. 2010)**. Jej silniejsze ufosforylowanie w nasieniu białym może wskazywać na utrzymywanie przez enzym homeostazy w poziomie lipidów w ejakulacie jak i uczestniczeniu w ochronie przed skutkami oddziaływania stresu oksydacyjnego.

Peroksyredoksyny (PRDX) odgrywają ważną rolę w ochronie antyoksydacyjnej i regulacji poziomu reaktywnych form tlenu (RFT) w plemnikach. PRDX6 odgrywa główną rolę w neutralizacji RFT w celu podtrzymania żywotności i ruchliwości plemników oraz umożliwienia im osiągnięcia zdolności zapładniającej. Brak ekspresji PRDX6 w nasieniu jest wystarczający do uzyskiwania gorszych wskaźników zapładnialności. Plemniki PRDX6-/- w większości wykazują niską ruchliwość i poważne uszkodzenia DNA, co przekłada się na zmniejszoną ilość zapłodnionych oocytów i/lub powstanie małej liczby zygot w próbach przeprowadzanych *in vitro* **(O'Flaherty 2018)**. Ponadto, w takich plemnikach wiele białek ulega karbonylacji i S-glutationylacji, co wskazuje na stres oksydacyjny występujący w komórce. Z kolei wysoki poziom S-glutationylacji białek w plemnikach PRDX6-/- odpowiada za szybkie wyczerpywanie poziomu wewnątrzkomórkowego GSH **(Ozkosem i in. 2016)**. Znacznie niższa ruchliwość

obserwowana w plemnikach PRDX6-/- w może także wynikać z hamowania enzymów wymaganych do produkowania ATP i tiolowego utleniania **(de Lamirande i Gagnon 1992a, de Lamirande i Gagnon 1992b)**. Występowanie w plazmie białego nasienia indora peroskyredoksyny 1 i 6 świadczy o bogatej i wydajnej ochronie przeciwdziałającej skutkom stresu oksydacyjnego. Wielu autorów sugeruje konieczność występowania złożonego systemu antyoksydacyjnego w nasieniu indora ze względu na specyfikę budowy plemników, jak i małą objętość ejakulatów tego gatunku.

Oksydaza sulfhydrylowa 1 (QSOX1) bierze udział w fałdowaniu białek, rozwoju zewnątrzkomórkowego matrix, utrzymaniu homeostazy retikulum endoplazmatycznego i regulacji cyklu komórkowego **(Kodali i Thorpe 2010)**. W ejakulacie QSOX1 ulega ekspresji głównie w plazmie nasienia i podlega fosforylacji reszt serylowych, treonylowych oraz tyrozylowych. Rola enzymu w męskim układzie rozrodczym nadal pozostaje trudna do zdefiniowania. Katalizuje on oksydację grup tiolowych z jednoczesnym wytworzeniem wiązań disiarczkowych. Zagregowane formy plemników, pozyskane z męskich ejakulatów, wykazywały silniejszą ekspresję QSOX1 oraz wyższe zawartości wewnątrzkomórkowych form wolno rodnikowych, aneksyny V i wolnych powierzchniowych tioli. Najprawdopodobniej oksydaza może powodować aglutynację plemników podatnych na atak wolnych rodników oraz apoptozę **(Wang i in. 2021b)**. Jej działanie w nasieniu indora może najprawdopodobniej pozwalać na odseparowywanie uszkodzonych plemników i jednoczesne zwiększanie jakości ejakulatu oraz redukowanie skutków oddziaływania stresu oksydacyjnego.

Z kolei dzięki wykorzystaniu elektroforezy 2D-PAGE oraz spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF potwierdzono część wyników uzyskanych metodą Nano LC-MS/MS. W plazmach nasienia z syndromem YSS zaobserwowano wyższą ekspresję ufosforylowanej formy łańcucha lekkiego immunoglobuliny ze stałym regionem, łańcucha immunoglobuliny lambda 1-X2, apolipoproteiny A1, białka podobnego do SSC5D-1, α-1-kwaśnej glikoproteiny, albuminy oraz kinazy kreatynowej typu B. Zarówno łańcuchy immunoglobulin jak i APOA1 są naturalnymi składowymi plazmy nasienia. Dzięki zastosowaniu chromatografii FPLC oraz elektroforezy SDS-PAGE z męskiej plazmy nasienia wyizolowano około 250 kDa komponent, który wpływał na aktywację ruchu plemników. Analiza jego sekwencji aminokwasowej wykazała obecność trzech składowych to jest apolipoproteiny A1 oraz łańcucha ciężkiego i lekkiego immunoglobulin. Zdolność aktywowania ruchu plemników przez omawiany kompleks była hamowana poprzez jego

degradację, co sugeruje rolę wzajemnych interakcji wszystkich składowych w zwiększaniu ruchliwości plemników. Potwierdziły to próby aktywowania ruchu plemników poprzez poszczególne komponenty kompleksu oddzielnie. Działanie żadnego z nich nie wykazywało tak spektakularnego efektu **(Akerlöf i in. 1991)**. Doniesiono, że APOA1 indukuje wypływ cholesterolu z plemników. Kontrolowany wyciek cholesterolu z plazmolemy reguluje wiele kaskad sygnałowych odpowiedzialnych za ruchliwość, hiperaktywację i kapacytację plemników. APOA1 jest częścią lipoprotein o dużej gęstości (HDL) i wyzwala reakcję akrosomową. Apolipoproteina 1 jest białkiem osocza nasienia, które wpływa na wiązanie plemnika z oocytem i ostatecznie na męską płodność **(Kwon in. 2014)**. Zidentyfikowano mRNA APOA1 w męskich plemnikach, a białko APOA1 o masie cząsteczkowej 31 kDa zlokalizowano w regionie postakrosomowym i szyjce plemników. Dodanie przeciwciał skierowanych przeciwko APOA1 do medium wpływa na zwiększony wypływ cholesterolu z męskich plemników i jednocześnie hamuje zajście procesu zapłodnienia *in vitro*. Ponadto dodanie omawianych przeciwciał zmniejsza ruchliwość i zwiększa apoptozę plemników. Stąd wskazuje się, że APOA1 odgrywa ważną rolę w utrzymaniu stabilności cholesterolu i ruchliwości plemników, przeżywalności i procesie zapłodnienia **(Chi i in. 2022)**. W niniejszej pracy stwierdzono obecność zarówno apolipoproteiny 1 jak i łańcuchów immunoglobulin w nasieniu indorów. Mimo, że nie stwierdzono występowania interakcji pomiędzy omawianymi białkami, to ich wspólne występowanie w wielu prążkach poddanych identyfikacji może wskazywać na coś innego. Być może i w nasieniu indora dochodzi do powstawania kompleksu wpływającego na ruch gamet. Obecność takiego kompleksu w nasieniu indorów z YSS mogłaby rekompensować jego gorsze parametry jakościowe. Z drugiej strony nadmierna fosforylacja APOA1 w nasieniu żółtym może wpływać na aktywność enzymu i powodować niekontrolowany wyciek cholesterolu z plemników a tym samym upośledzać ich funkcjonalność.

Rodzina bogatych w cysteinę receptorów o charakterze zmiataczy (SRCR) obejmuje grupę białek przyłączonych do błony cytoplazmatycznej lub wydzielanych zewnątrzkomórkowo. Zawierają one jedną, lub więcej, domen strukturalnie podobnych do dystalnej domeny błony receptora zmiatacza makrofagów typu I. Chociaż rodzinie SRCR nie przypisano żadnej złożonej funkcji biologicznej, wykazano, że niektóre z tych receptorów rozpoznają sekwencje molekularne patogenów (PAMP) to jest bakterii, grzybów lub innych drobnoustrojów. SSC5D jest niedawno opisanym rozpuszczalnym receptorem SRCR wytwarzanym przez monocyty, makrofagi oraz limfocyty T. Struktura omawianego

białka składa się z N-końcowej części, która zawiera pięć modułów SRCR i dużej C-końcowej domeny podobnej do mucyny **(Pereira i in. 2016)**. Wydaje się prawdopodobnym, że SSC5D odgrywa rolę łącznika pomiędzy procesami związanymi z odpornością nabytą i wrodzoną oraz bierze udział w funkcjonowaniu łożyska **(Gonçalves i in. 2009)**. Być może w nasieniu indora białko to odpowiada za ochronę plemników przed patogenami obecnymi w ejakulacie. Jego występowanie w żółtych ejakulatach może wskazywać na obecność makrofagów lub limfocytów w tym rodzaju nasienia i zwiększoną potrzebę jego ochrony przed działaniem czynników zewnętrznych. Nie zaobserwowano sezonowych wahań w stężeniu leukocytów w nasieniu. Obecność białych krwinek w ejakulacie jest bardziej związana z występowaniem subklinicznej infekcji lub panującej temperatury czy pory roku **(Centola i Eberly 1999)**.

Kwaśna glikoproteina α1 ulega silnej ekspresji we wszystkich tkankach męskiego układu rozrodczego. Wykazuje ona działanie immunomodulujące i jest odpowiedzialna za utrzymanie optymalnej jakości plemników podczas ich przesuwania się w męskim, a następnie po zdeponowaniu w żeńskim układzie rozrodczym. Glikoproteina jest postrzegana jako biomarker stanu tkanek, ponieważ jest białkiem ostrej fazy (BOF) wytwarzanym w odpowiedzi na chroniczne układowe reakcje zapalne. Ponadto jest jednym z najważniejszych białek plazmy nasienia zdolnym do wiązania i transportu kilku ligandów endogennych wytwarzanych w odpowiedzi na stan zapalny **(Pereira Silva i in. 2021)**. Białko ORM2 jest jednym spośród 21 polipeptydów, których zawartość wzrasta w męskiej plazmie pochodzącej z nasienia charakteryzującym się wysokim stopniem fragmentacji DNA plemników **(Intasqui i in. 2013b)**. Co więcej, nasiloną ekspresję omawianego białka, podobnie jak aneksyny A2 (ANXA2), stwierdzono u pacjentów z żylakami powrózka nasiennego **(Panner Selvam i in. 2021)**. Obecność ORM2 w ejakulatach osobników z YSS można tłumaczyć występowaniem wyższego odsetka plemników z defragmentowanym DNA w tym rodzaju nasienia.

Większość biodostępnego żelaza jest transportowana do mitochondriów w celu ułatwienia syntezy hemu, podczas gdy jego niewielka część jest wykorzystywana do tworzenia ferrytyny. Ferrytyna składa się z łańcucha ciężkiego (FTH/FHC) i łańcucha lekkiego (FTL). Może ona absorbować dwuwartościowe żelazo w celu przechowywania go w cytoplazmie. Ponadto ferrytyna posiada również zdolność zmiatania wolnych rodników związanych z żelazem i zapobiegania apoptozy komórek wynikającej z nadmiaru żelaza **(Liu i in. 2022)**. FTH odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy jonów żelaza,

regulowaniu odpowiedzi na stres oksydacyjny, apoptozie komórek, rozwoju pęcherzyków jajnikowych i innych procesach fizjologicznych **(Xu i in. 2016)**. Zaburzenia w poziomie komórkowej FTH przyczyniają się do patogenezy wielu chorób. Są to choroby związane nie tylko z pozyskiwaniem, transportem i magazynowaniem żelaza, ale także choroby charakteryzujące się występowaniem stanu zapalnego i/lub długotrwałej infekcji. FTH zawiera w swojej budowie wiele reszt serylowych i treonylowych łatwo ulegających fosforylacji. W komórkach nabłonkowych ptaków zaobserwowano chaperon ferrytyny, określany jako "ferrotoid", który może pośredniczyć w transportowaniu ferrytyny do jądra komórkowego. Wykazano związek pomiędzy fosforylacją reszt ferrytyny a translokacją jądrową FTH. Zahamowanie fosforylacji FTH może częściowo blokować ten proces. Wykazano, że ferrytyna jądrowa chroni DNA przed uszkodzeniami DNA zależnymi od promieniowania UV lub jonów żelaza **(Li in. 2006)**. W niniejszej pracy potwierdzono obecność ufosforylowanej formy FTH w nasieniu indora. Jej wzmożona fosforylacja w nasieniu YSS może mieć związek z koniecznością ochrony DNA zawieszonych w nim plemników.

Dzięki wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE oraz spektrometrii Nano-LC/MS/MS w plemnikach indora wykazano obecność ufosforylowanej formy fosfolipazy C zeta 1 (PLCZ1). Rodzina białek PLC jest grupą enzymów zaangażowaną w katabolizm fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforanu do IP3 i diacyloglicerolu (DAG). Znanych jest 13 izoform PLC wyodrębnionych ze względu na pełnioną przez siebie funkcję oraz strukturę białka. PLCZ1 jest obecnie najmniejszą znaną izoformą fosfolipazy z masą cząsteczkową wynoszącą 70-75 kDa u różnych gatunków **(Abdulsamad i in. 2023)**. Specyficzna dla plemników fosfolipaza C zeta 1 (PLCZ1) została uznana za dominujący czynnik inicjujący kontakt pomiędzy plemnikiem a oocytem. PLCZ1 wyzwala aktywację oocytów poprzez uwalnianie IP3 i Ca^{2+} podczas procesu zapłodnienia **(Vasisth i in. 2022)**. Ponadto, fosfolipaza jest ważnym enzymem biorącym udział w spermatogenezie. Zlokalizowana jest ona głównie w regionach akrosomowym i postakrosomowym. Podczas zachodzenia procesu kapacytacji i reakcji akrosomowej plemników jej rozmieszczenie komórkowe ulega zmianie, co dowodzi jej wpływu na ostateczną jakość plemników. **Wang i inni (2023)** zasugerowali, że PLCZ1 pełni kluczową rolę w utrzymaniu ruchliwości plemników w układzie rozrodczym samca myszy. Z kolei **Unnikrishnan i inni (2021)** dowiedli, że podczas procesu kapacytacji białko jest aktywowane poprzez fosforylację reszt tyrozylowych plemników i jego interakcję z Na/K ATPazą α4 (ATP1A) oraz receptorem

naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR). Stąd jakakolwiek nieprawidłowość związana z konformacją białka może prowadzić do bezpłodności. W niniejszej pracy wykazano obecność PLCZ1 zarówno w plazmie jak i plemnikach indorów. Masa cząsteczkowa omawianego enzymu wynosi około 73,5 kDa (MASCOT), jednak w identyfikowanych prążkach masa wyliczana przez program Multi-Analyst była o wiele niższa. Podejrzewamy, że PLCZ1 mogła ulegać rozpadowi na mniejsze podjednostki, być może w wyniku działania procesu obróbki nasienia lub oddziaływania detergentów. Zaobserwowano jej silniejszą fosforylację w nasieniu białym, co może wskazywać na istotną rolę omawianego enzymu w nabyciu potencjalnej zdolności zapładniającej przez plemniki.

W plemnikach z nasienia białego wykazano silniejszą ekspresję także między innymi białka aniono i napięciozależnego kanału jonowego (VDAC2), poliubikwityny B (UBB), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), tubulin (TBB) oraz kinazy kreatynowej typu S (CKMT2). Białka z rodziny VDAC uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych, ale i patofizjologicznych (na przykład metabolizmie energetycznym czy apoptozie komórek) poprzez regulowanie przepuszczalności błony dla małych jonów i cząsteczek (np. Na^+, Ca^{2+}, Cl^-, ATP, glutaminianu). Wyniki ostatnich badań sugerują, że VDAC może odgrywać ważną rolę w spermatogenezie, ruchliwości, kapacytacji i reakcji akrosomowej plemników. Co więcej, wykazano, że VDAC2 jest ważnym ogniwem szlaku śmierci komórkowej, gametogenezy i steroidogenezy. Jest także zaangażowane w ochronę przed stresem oksydacyjnym. Biorąc pod uwagę wysoką liczebność VDAC2 i VDAC3 w plemnikach buhaja oraz ich zdolność do bramkowania i wiązania ATP zasugerowano, że białka te mogą być zaangażowane w przemieszczanie i kierowanie ATP do położonych najbardziej dystalnie w witce ATPaz dyneinowych i/lub w ochronie ATP przed przedwczesną hydrolizą **(Hinsch i in. 2004)**. Zależne od napięcia kanały anionowe (VDAC) są obecne we wszystkich typach białek mitochondrialnych u eukariontów. Występują trzy izoformy kanałów to jest VDAC1, VDAC2 i VDAC3. Kolejne doniesienia potwierdzały obecność różnych izoform VDAC w różnych tkankach męskiego układu rozrodczego to jest VDAC1 w komórkach Sertoliego, VDAC2 w różnych regionach plemników (zwłaszcza zewnętrznej błonie mitochondrialnej i gęstych zewnętrznych włóknach osiowych witki) oraz VDAC3 w regionie akrosomu plemników. HSP70 aktywuje ruch witki plemników wiążąc się z ich powierzchnią poprzez interakcję z białkiem VDAC2. Powyższe wiązanie wydaje się odgrywać ważną rolę w transporcie plemników w jajowodzie **(Matsuzaki i Sasanami 2022)**. Natomiast wysoka ekspresja mRNA VDAC2 wykazuje dodatnią korelację z niską

ruchliwością plemników. Co więcej, nieprawidłowa ekspresja białek z rodziny VDAC może być związana z niepłodnością męską spowodowaną idiopatyczną astenozoospermią **(Liu i in. 2010)**. Aktywność kinazy kreatynowej (CK) w ludzkich plemnikach jest wskaźnikiem dojrzałości gamet i ich potencjału zapładniającego. Izoenzym CK-Mi w ludzkich plemnikach jest pochodzenia mitochondrialnego. MtCK ulega koekspresji razem z cytozolowymi podjednostkami typu mózgowego w wielu komórkach i tkankach charakteryzujących się wysokim zapotrzebowaniem na energię takich jak mózg, łożysko, nerki, jądra, plemniki i komórki śródbłonka. MtCK jest centralnym kontrolerem komórkowej homeostazy energetycznej **(Schlattner i in. 2006)**. MtCK jest głównym celem uszkodzeń molekularnych indukowanych stresem oksydacyjnym, a jej dysfunkcję notuje się przy wszelkiego rodzaju zaburzeniach neurodegeneracyjnych organizmu **(Kekelidze i in. 2001)**. Mi-CK zużywa ATP produkowany w mitochondriach w celu zsyntetyzowania fosfokreatyny. Fosfokreatyna jest następnie przetransportowywana do cytoplazmy, gdzie dochodzi do regeneracji ATP przy udziale izoenzymów cytozolowych. Fosforylacja CK zwiększa, podczas gdy defosforylacja zmniejsza jej aktywność **(Palmer i in. 2008)**. Silniejsza fosforylacja VDAC2 i CKMT2 w nasieniu białym najprawdopodobniej związana jest z wydajniejszą gospodarką energetyczną plemników.

Z kolei w plemnikach pochodzących z nasienia żółtego zaobserwowano intensywniejszą fosforylację CKB, TTR, PRDX1, RBP4 i TPI1. Fosforylacja kinazy kreatynowej B, przez kinazę białkową C, powoduje wzrost jej aktywności poprzez zwiększenie zdolności do przenoszenia wysokoenergetycznej reszty fosforanowej z fosfokreatyny na ADP i wytwarzania w ten sposób ATP **(Chida i in. 1990)**. Z kolei kinaza białkowa aktywowana AMP może regulować aktywność CK poprzez fosforylację jej reszt serynowych. Oba enzymy ściśle współpracują w warunkach stresu energetycznego, aby zrekompensować utratę adenozynotrifosforanu (ATP) **(Rios i in. 2014)**. Ustalono, że aktywności obu typów kinazy kreatynowej (CKM i CKB) oraz ich wzajemne stosunki mogą być biochemicznymi markerami dojrzałości plemników i ich potencjału zapładniającego. Wysoka aktywność CK w plemnikach wskazuje na obecność pozostałości cytoplazmatycznych w ich strukturze oraz słabą jakość gamet **(Nasrallah i in. 2020)**. **Rao i inni (1989)** zasugerowali istnienie zależności pomiędzy nieprawidłowo przeprowadzonym procesem pozbywania się pozostałości cytoplazmatycznych a wystąpieniem zjawiska stresu oksydacyjnego w plemnikach. Do peroksydacyjnych uszkodzeń często dochodzi w wyniku występowania nieprawidłowości morfologicznych we wstawkach plemników, w których

zazwyczaj zlokalizowany jest nadmiar resztkowej cytoplazmy. Nadmiar ten może stymulować produkcję $O^{2.-}$ poprzez rosnącą dostępność NADPH powstającego z kolei w wyniku zwiększonej aktywności G6PDH. Dowiedziono istnienia szeregu reakcji obejmujących zatrzymanie nadmiaru resztkowych enzymów cytoplazmatycznych, takich jak CK i G6PDH oraz zwiększone wytwarzanie RFT a wraz z tym indukcję peroksydacji lipidów oraz pojawienie się dysfunkcji plemników **(Dandekar i Parkar 1999)**.

Transtyretyna odpowiada przede wszystkim za transport tyroksyny i kompleksu wiążącego retinol (kompleksu RBP) do różnych części ciała i mózgu. TTR jest białkiem surowicy składającym się z czterech monomerów 14 kDa występujących w połączeniu z RBP (1:1). Dowiedziono, że taka budowa kompleksu zapobiega filtracji kłębuszkowej RBP. Retinoidy bezpośrednio wpływają na ekspresję genów regulujących cykl komórkowy w fazie G1 mitozy. Krążący retinol (Rol) jest wiązany z RBP i kompleksowany z TTR. Jest on następnie przetransportowywany do komórek mioidalnych okołotubularnych, a następnie przechodzi do komórek Sertoliego i komórek spermatogennych omijając barierę krew-jądro **(Chung i Wolgemuth 2004)**. TTR wykazuje działanie zarówno anty- jak i prooksydacyjne. Poziom TTR koreluje z poziomem reaktywnych form tlenu (RFT) oraz reaktywnych form azotu (RFA) **(Fong i Vieira 2013)**. Mimo, że TTR jest białkiem zewnątrzkomórkowym to może indukować powstawanie stresu oksydacyjnego w retikulum endoplazmatycznym (ER), a tym samym pośredniczyć w procesie odpowiedzi na białka niesfałdowane (UPR) **(Chen i in. 2016)**. Chociaż udowodniono, że TTR w osoczu występuje głównie w formie sprzężonej z cysteiną (Cys) za pomocą analizy ESI-MS dowiedziono występowania pochodnych TTR o zwiększonych masach cząsteczkowych to jest o 32 Da (dihydroksylacja), 80 Da (fosforylacja) i 306 Da (glutationylacja) **(Terazaki i in. 1998)**. Silniejszy stopień jej ufosforylowania może pośrednio wskazywać na nasilenie procesów prooksydacyjnych toczących się w nasieniu indorów z YSS.

5.6. Wpływ sezonu na profil ufosforylowania białek nasienia

Procesy fosforylacji białek nasienia mogą być zależne od sezonu. Niektóre enzymy, takie jak fosfataza kwaśna (ACP) i fosfataza alkaliczna (ALP), są bardzo wrażliwe na zmiany powodowane sezonem, a ich aktywność wiąże się z produkcją białek w najądrzach **(Dyrda i in. 2021)**. W niniejszej pracy zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą aktywność ACP w plazmach nasienia w okresie jesienno-zimowym, natomiast nie

zanotowano istotnych różnic w aktywnościach ALP pomiędzy obydwoma badanymi okresami. Co innego wykazał **Prabakar i in. (2022)** który zaobserwował wzrost aktywności ALP w plazmie nasienia indora w cieplejszych miesiącach roku. Wynik ten mógł wynikać z wykorzystania w omawianych badaniach nasienia innej linii indorów lub wyodrębnienia przez wyżej wymienionego autora tylko trzech okresów roku to jest zimy, wiosny i lata. Z drugiej strony w omawianym doświadczeniu wspomniany autor badał również aktywność ALP u kogutów rasy White Leghorn, gdzie aktywność fosfatazy alkalicznej w plazmie nasienia była wyższa w okresie zimy. Ostatecznie jednak **Prabakar i inni (2022)** zauważyli, że nasienie indora pochodzące z okresu zimy charakteryzowało się lepszymi parametrami przyżyciowymi plemników, lepszym stosunkiem zawartości hormonów płciowych i wyższą aktywnością antyoksydacyjną. Z kolei **Strzeżek i inni (2015)** nie wykazali sezonowo zależnych różnic w aktywności ALP w plazmie nasienia psa, natomiast zaobserwowali je w przypadku ACP. Odnotowali oni istotnie ($p < 0,05$) najniższe aktywności fosfatazy kwaśnej w okresie jesieni. W analizach realizowanych w ramach niniejszej pracy, po uwzględnieniu rodzaju ejakulatu, z którego była uzyskiwana plazma, wykazano, że aktywność ALP pozostaje na podobnym poziomie w nasieniu białym, natomiast jest wyższa w sezonie jesienno-zimowym w nasieniu żółtym. Natomiast aktywność ACP wzrasta w trakcie sezonu jesienno-zimowego w obu rodzajach nasienia indorów. Ponadto wykazano istnienie dodatnich korelacji pomiędzy zawartością białka a aktywnością ALP oraz między aktywnością ACP a aktywnością GPx w białych plazmach nasienia w sezonie jesienno-zimowym. Z kolei w żółtych plazmach nasienia, w omawianym okresie, aktywność ALP korelowała z poziomem GSH ($p < 0,05$). Co istotne, w przypadku obu rodzajów nasienia indora wyższa aktywność fosfataz kwaśnej i alkalicznej w okresie wiosenno-letnim wiązała się z istotnie wyższym poziomem generowanego MDA w plazmie. Może to dowodzić, że część białek, odpowiadających za status antyoksydacyjny nasienia, podlega procesom defosforylacji.

Sezon wpływał na stopień ufosforylowania wybranych białek obecnych w nasieniu indorów w zróżnicowany sposób. Tak było w przypadku wybranych polipeptydów z plazmy nasienia to jest owotransferyny (TRFE), ATPazy 13a4 transportującej kationy (ATP13α4) oraz chaperonu BIP z retikulum endoplazmatycznego (HSPA5). W przypadku owotransferyny jej silniejsza fosforylacja w sezonie wiosenno-letnim mogła być związana ze zmianą jej struktury w celu zwiększenia odporności na wysokie temperatury i/lub zwiększoną aktywnością bakteriobójczą **(Wang i in. 2021c)**. Wykazano, że izoforma

α4 ATPazy bierze udział w regulacji ruchliwości plemników i pośrednio determinuje ich zdolność zapładniającą. Gen męskiej α4 ATPazy zlokalizowany jest w jądrach, a wzrost jego ekspresji powiązano z procesem dojrzewania płciowego. ATPaza będąca produktem działania genu występuje w plemnikach głównie w rejonie witki **(McDermott i in. 2012)**. Posiada ona jedno zakonserwowane miejsce fosforylacji dla kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP - PKA. Fosforylacja tego miejsca jest ważna dla regulacji aktywności działania pompy albo poprzez zmianę rozkładu komórkowego, albo poprzez bezpośrednią zmianę właściwości kinetycznych enzymu **(Poulsen i in. 2010)**. Fosforylacja omawianego enzymu wydaje się niezbędna do nabycia przez plemniki indora zdolności do ruchu. Obniżona ekspresja Na^+/K^+-ATPazy w morfologicznie nieprawidłowych plemnikach, powstających podczas oddziaływania wysokich temperatur, dowodzi znaczenia tego białka w regulacji funkcji plemników oraz wykorzystania go jako potencjalnego markera płodności **(Thundathil i in. 2012)**. Jej silniejsze ufosforylowanie w okresie wiosenno-letnim może być zabezpieczeniem aktywności biologicznej enzymu w nasieniu indora.

Sezon wpływał także na zawartość frakcji albuminy w plazmie nasienia indora. Zaobserwowano dwie frakcje albuminy, które wykazywały zróżnicowane profile fosforylacji w zależności od sezonu. Jedna z nich o masie 42,9 kDa i punkcie izoelektrycznym równym 4,40 ulegała wyższej ekspresji w trakcie sezonu wiosenno-letniego, z kolei druga z nich (72,1 kDa, pI 8,17) w sezonie jesienno-zimowym. Jak dotąd zaobserwowano wyższą zawartość albuminy w układzie rozrodczym i plazmie nasienia indorów z YSS w porównaniu z indorami produkującymi nasienie białe **(Słowińska i in. 2017)**, ale nie zanotowano różnic w jej zawartości związanych z panującym okresem roku. Albumina plazmy nasienia może wpływać na skład lipidowy błony komórkowej plemników poprzez wymianę wybranych lipidów lub ich hydrolizę **(Go i Wolf 1985)**. Jedną z głównych różnic między usuwaniem cholesterolu, w którym pośredniczy albumina, a usuwaniem z udziałem HDL lub APOA1, jest sposób w jaki zachodzi ten proces. Badania przeprowadzone na komórkach somatycznych wykazały, że proces usuwania cholesterolu przez albuminę jest procesem pasywnym, w którym kontakt z błoną komórkową umożliwia desorpcję cholesterolu do hydrofobowej kieszeni struktury molekularnej albuminy **(Sankaranarayanan i in. 2013)**. Co ciekawe, **Matsuzaki i inni (2020)** zademonstrowali obecność albuminy w kanalikach SST. ALB tam występująca jest najprawdopodobniej zaangażowana w proces przechowywania plemników w SST i przedłużanie ich żywotności. Z kolei **Mereuţă i inni (2015)** wykazali, że po wystawieniu nasienia buhaja na działanie

temperatury 45°C przez 1 minutę następuje wzrost zawartości albuminy o 4,2%, a po 10 minutach o 3,3% całkowitej zawartości białka. Może to pośrednio wskazywać na występowanie wybranych frakcji albumin w nasieniu indora w sezonie wiosenno-letnim spowodowane oddziaływaniem wyższych temperatur.

W plemnikach zaobserwowano najprawdopodobniej sezonowo uwarunkowane ufosforylowanie między innymi RPS27A, RAP1B, transtyretyny (TTR), proakrozyny (ACR), kinazy keratynowej B (CKB) oraz łańcucha tubuliny beta 4 (TBB4). Akrozyna jest syntetyzowana i magazynowana w postaci zymogenu czyli proakrozyny. Aby mogła wykazywać aktywność musi przejść w formę dojrzałą i zostać aktywowana w procesie egzocytozy akrosomu. Analiza immunocytochemiczna wykazała, obecność systemu proakrozyna/akrozyna w akrosomie ejakulowanych i ulegających kapacytacji męskich plemników. Aktywacja formy h-proakrozyny (55-60 kDa) do aktywnego enzymu, beta-akrozyny (34 KDa), może zajść w wyniku podniesienia pH środowiska. Proces ten obejmuje nie tylko zmiany w obrębie N- i C-końców białka (powstanie enzymatycznie aktywnych półproduktów o masach 52, 43, 24-22 i 16 kDa), ale i fosforylację wybranych reszt serynowo-treoninowych która zwiększa odporność na wewnątrzkomórkową proteolizę oraz efektywność działania enzymu **(Vazquez-Levin i in. 2005)**. Według **Ciereszko i innych (2000)** akrozyna w plemnikach knurów wykazuje zmienną aktywność, wyraźnie warunkowaną sezonem. Zmiany te jednak tylko częściowo pokrywają się z innymi parametrami jakości nasienia. Autorzy zaproponowali, że zaobserwowane zmiany w aktywności akrozyny mogą być powodowane zaburzeniami procesu spermatogenezy podczas oddziaływania wysokich temperatur w okresie lata. Zakłócenia te mogą z kolei wywoływać albo spadek zawartości akrozyny w plemnikach albo skutkować słabą jakością błon plemników. Białko TUBB4B należy do rodziny genów β-tubuliny i jest głównym składnikiem mikrotubul, które wpływają na procesy migracji przedjądrzy u myszy. β-tubulina ma osiem izoform – TUBB, TUBB2A, TUBB2B, TUBB3, TUBB4, TUBB2C, TUB6, mikrotubule TBB1A. Białka tworzą heterodimery, które tworzą włókna prekursorowe mikrotubul. Te niewypełnione rurki są kluczowym elementem cytoszkieletu i biorą czynny udział w dynamice wielu procesów komórkowych. Właściwie wykształcona i kompletna sieć mikrotubularna w plemnikach jest niezbędna do prawidłowej spermatogenezy. Zajście procesów modyfikacji potranslacyjnych w obrębie podjednostek tubuliny, na przykład fosforylacji, może regulować interakcję pomiędzy mikrotubulami a białkami związanym z mikrotubulami (MAP), wpływając tym samym na dynamiczną

niestabilność mikrotubul i zdolność do przyjmowania różnych form w komórce. W interfazie mikrotubule znajdują się w pobliżu jądra, w centrosomie (ujemny koniec) i promieniują w kierunku obwodu komórki (koniec dodatni), utrzymując kształt komórki oraz interakcję komórka-komórka, adhezję komórka-macierz, transport białka i ruch komórki **(Gadadhar i in. 2017)**. Poziom ekspresji TUBB4B ma kluczowe znaczenie w interakcjach mikrotubul z wimentyną i utrzymaniu polarności migrujących komórek. Komórki prezentujące niższą ekpresję TUBB4B wykazują szybsze tempo agregacji mikrotubul. Nieprawidłowa ekspresja białka TUBB4B wydaje się być też związana z podziałem i proliferacją komórek **(Sobierajska i in. 2019)**. Wyższy stopień ufosforylowania TBB4 w plemnikach indora w sezonie wiosenno-letnim może wskazywać na wyższą fluktuację form tubuliny i tworzenie form pochodnych o różnej aktywności biologicznej. Obecność TBB4 może się też wiązać z lepszym zabezpieczeniem struktur komórek plemnikowych w trakcie trwania cieplejszych miesięcy roku.

5.7. Podsumowanie

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy były pierwszą próbą zidentyfikowania oraz scharakteryzowania fosfoproteomu nasienia indorów. Spośród wszystkich modyfikacji potranslacyjnych fosforylacja białek pełni rolę nadrzędną i jest niezbędna do właściwego przeprowadzenia procesu zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik. Wyniki niniejszej pracy mogą pomóc wyjaśnić dynamikę zachodzenia procesów fosforylacji/defosforylacji i ich znaczenie w fizjologii nasienia samców indorów. Przeprowadzone badania mogą także pomóc w dokładnej analizie fosfoproteomu nasienia indorów produkujących nasienie o obniżonej jakości i wyłonić potencjalne markery stanów patologicznych lub związanych z obniżoną płodnością. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na zróżnicowanie profili fosforylacji białek nasienia warunkowanych rodzajem ejakulatu indora. Ponadto scharakteryzowano zmiany fosfoproteomu plazm nasienia i plemników indorów występujące w wyodrębnionych okresach roku. Fosfoproteiny nasienia indora, zidentyfikowane w toku niniejszej pracy, przede wszystkim odgrywają rolę w zapłodnieniu komórki jajowej przez plemnik, organizacji cytoszkieletu, regulacji transportu wewnątrzkomórkowego oraz reakcjach metabolicznych związanych z generowaniem zasobów energetycznych w komórce.

6. Wnioski

1. Nasienie żółte indorów (*Meleagris gallopavo*) charakteryzowało się obniżonymi parametrami jakościowymi w stosunku do nasienia białego. W plazmach nasienia żółtego wykazano wyższe zawartości GSH i MDA oraz wyższe aktywności ALP, ACP i GPx. Plemniki z nasienia żółtego charakteryzowały się niższą zawartością MDA, niższymi wskaźnikami PMI i MMP, wyższą aktywnością enzymów antyoksydacyjnych i zawartością GSH. Ponadto w nasieniu żółtym obserwowano niższy odsetek plemników żywych oraz wyższe odsetki plemników apoptotycznych i nekrotycznych,

2. Ejakulaty pobrane podczas sezonu jesienno-zimowego cechowały się wyższym odsetkiem plemników z nienaruszoną plazmolemą w rejonie akrosomowym w porównaniu z ejakulatami z okresu wiosenno-letniego. Plazmy nasienia z okresu JZ odznaczały się niższą aktywnością GPx i CAT oraz niższymi poziomami GSH i MDA. Nasienie z tego okresu charakteryzowało się także wyższym odsetkiem plemników żywych oraz niższymi odsetkami plemników apoptotycznych i nekrotycznych. Dodatkowo plemniki w sezonie jesienno-zimowym cechowały się wyższą zawartością GSH i niższą MDA w porównaniu do sezonu wiosenno-letniego,

3. Statystycznie istotnie wyższe poziomy aktywności fosfataz kwaśnej i alkalicznej obserwowano w plazmach nasienia pochodzących od indorów z syndromem YSS. Podczas sezonu jesienno-zimowego aktywność fosfatazy kwaśnej była wyższa niż w czasie sezonu wiosenno-letniego,

4. Zarówno występowanie syndromu YSS jak i trwający sezon wpływały na profile ufosforylowania reszt serylowych i tyrozylowych białek proteomów plazm nasienia i plemników indorów,

5. W pracy zidentyfikowano 142 fosfoproteiny. Wśród nich znajdowały się białka kodowane przez następujące geny: UBB, RPS27A, SPATA18, CDC42, ACTN, TBB, ACTA, ODF2, GAPDH, PGAM, PGK, TPI, ALDOC, LDH, SDHA, FASN, APOA, CKM, GOT, CA, CALM, TRFC, FTH, HSPA, HSP, GST, PRDX, QSOX, ASTL, ANXA, ACR, GSN, VDAC oraz PLCZ1,

6. Wykazano, że fosfoproteiny zidentyfikowane w ramach niniejszej pracy między innymi biorą udział w interakcji i wiązaniu się plemnika z komórką jajową, procesie

zapłodnienia oocytu, organizacji cytoszkieletu, metabolizmie plemników, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz ustalaniu składów proteomów poszczególnych przedziałów komórkowych,

7. Dowiedziono, że stopień ufosforylowania białek kodowanych przez geny SPARC, FASN, PRDX1, PRDX6, QSOX1, TRFE i PPIB był statystycznie istotnie wyższy w plazmach białego nasienia. W plazmach nasienia żółtego intensywniej ufosforylowane były białka kodowane przez geny: CKB, ORM2, APOA1, SSC5D, IGLC3, LAC oraz FTH. Z kolei w czasie sezonu wiosenno-letniego wyższym stopniem ufosforylowania charakteryzowały się białka kodowane przez geny: APOA1, LAC, QSOX1, PRDX1, PRDX6, GSN, HSP90, PPIB, FTH, ASTL, TTR, GOT1 oraz CKB. Podczas sezonu jesienno-zimowego takimi właściwościami cechowało się jedynie białko SPARC,
8. Zaobserwowano, że wyższym stopniem ufosforylowania cechowały się białka kodowane przez TBB, CKMT2, VDAC2, UBB i GAPDH w plemnikach nasienia białego oraz CKB, TTR, PRDX1, RBP4 i TPI1 w plemnikach nasienia żółtego. Zaobserwowano również, że wyższym nasileniem fosforylacji cechowały się białka kodowane przez geny: ACR, CKB i TBB4 podczas sezonu wiosenno-letniego oraz RPS27A, RAP1B i TTR podczas sezonu jesienno-zimowego.

7. Piśmiennictwo

1. Abdelqader A., Al-Fataftah A-R. **2016**. Effect of dietary butyric acid on performance, intestinal morphology, microflora composition and intestinal recovery of heat-stressed broilers. *Livestock Science*, 183:78—83. doi: 10.1016/j.livsci.2015.11.026
2. Abdulsamad H.M.R., Murtaza Z.F., AlMuhairi H.M., Bafleh W.S., AlMansoori S.A., AlQubaisi S.A., Hamdan H., Kashir J. **2023**. The therapeutic and diagnostic potential of phospholipase C zeta, oocyte activation, and calcium in treating human infertility. *Pharmaceuticals*, 16(3):441. doi.org/10.3390/ph16030441
3. Adam K., Hunter T. **2018**. Histidine kinases and the missing phosphoproteome from prokaryotes to eukaryotes. *Laboratory Investigation*, 98(2):233-247. doi: 10.1038/labinvest.2017.118.
4. Aggarwal A., Upadhayay R. **2013**. Heat Stress and Immune Function. W: Heat Stress and Animal Productivity (red. A. Aggarwal, R. Upadhyay) *Springer*, New Delhi, 113-136. doi: 10.1007/978-81-322-0879-2.
5. Aire T.A. **2007**. Spermatogenesis and testicular cycles W: Reproductive Biology and Phylogeny of Birds: Phylogeny, Morphology, Hormones, Fertilization. vol. 6A (red. B.G.M. Jamieson), *Science Publishers*, Enfield, NH, 279-347.
6. Akerlöf E., Jörnvall H., Slotte H., Pousette A. **1991**. Identification of apolipoprotein A1 and immunoglobulin as components of a serum complex that mediates activation of human sperm motility. *Biochemistry*, 30(37):8986-8990. doi: 10.1021/bi00101a011.
7. Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L., Storey B.T. **1987**. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, 8(5):338-348. doi: 10.1002/j.1939-4640.1987.tb00973.x.
8. Amen M.H.M., Al-Daraji H.J. **2011**. Effect of dietary zinc supplementation on some seminal plasma characteristics of broiler breeder males. *International Journal of Poultry Science*, 10(10):814-818. doi: 10.3923/ijps.2011.814.818.
9. Asadpour R., Tayefi-Nasrabadi H. **2012**. Seasonal variation in antioxidant enzyme activity in seminal plasma in Holstein bulls. *Comparative Clinical Pathology*, 21(2):173–176. doi:10.1007/s00580-010-1080-8.

10. Asano A., Tajima A. **2017**. Development and preservation of avian sperm W: Avian Reproduction, Advances in Experimental Medicine and Biology (red. T. Sasanami), *Springer Nature Singapore*, Singapur, 59-73.
11. Atikuzzaman A., Sanz L., Pla D., Alvarez-Rodriguez M., Rubér M., Wright D., Calvete J.J., Rodriguez-Martinez H. **2017**. Selection for higher fertility reflects in the seminal fluid proteome of modern domestic chicken. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*, 21:27-40. doi: 10.1016/j.cbd.2016.10.006.
12. Audebert S., White D., Cosson J., Huitorel P., Eddé B., Gagnon C. **1999**. The carboxy-terminal sequence Asp427-Glu432 of beta-tubulin plays an important function in axonemal motility. *European Journal of Biochemistry*, 261(1):48-56. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00208.x.
13. Ayad B.M., Oyeyipo I.P., Van der Horst G., Du Plessis S.S. **2021**. Cementing the relationship between conventional and advanced semen parameters. *Middle East Fertility Society Journal*, 26:39. doi.org/10.1186/s43043-021-00086-z.
14. Ayo J.O., Obidi J.A., Rekwot P.I. **2011**. Effects of heat stress on the well-being, fertility, and hatchability of chickens in the northern Guinea savannah zone of Nigeria: a review. *ISRN Veterinary Science*, 011:838606. doi: 10.5402/2011/838606.
15. Bae J.W., Kim S.H., Kim D.H., Ha J.J., Yi J.K., Hwang S., Ryu B.Y., Pang M.G., Kwon W.S. **2019**. Ras-related proteins (Rab) are key proteins related to male fertility following a unique activation mechanism. *Reproductive Biology*, 19(4):356-362. doi: 10.1016/j.repbio.2019.10.001.
16. Bakst M.R., Bauchan G. **2015**. Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology*, 83(9):1438-1444. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.01.016.
17. Bakst M.R., Donoghue A.M., Yoho D.E., Moyle J.R., Whipple S.M., Camp M.J., Liu G.Q., Bramwell R.K. **2010**. Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation. *Poultry Science*, 89(5):986-992. doi: 10.3382/ps.2009-00481.
18. Bakst M.R., Richards M.P. **1985**. Concentrations of selected cations in turkey serum and oviductal mucosae. *Poultry Science*, 64(3):555-563. doi: 10.3382/ps.0640555.
19. Ball B.A., Medina V., Gravance C.G., Baumbe J. **2001**. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa

during storage at 5ºC. *Theriogenology*, 56(4):577-589. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00590-8.

20. Basuony H.A.M. **2011**. Effects of seasonal variations on thermoregulation of ostrich. Doctoral thesis, Biology Department, Nuclear Research Center, Atomic Energy Authority, Al-Azhar University, Cairo, Egypt,
21. Baumgard L.H., Rhoads R.P. Jr **2013**. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1:311-337. doi: 10.1146/annurev-animal-031412-103644.
22. Beckford R.C., Ellestad L.E., Proszkowiec-Weglarz M., Farley L., Brady K., Angel R., Liu H.C., Porter T.E. **2020**. Effects of heat stress on performance, blood chemistry, and hypothalamic and pituitary mRNA expression in broiler chickens. *Poultry Science*, 99(12):6317-6325. doi: 10.1016/j.psj.2020.09.052.
23. Belhadj Slimen I., Najar T., Ghram A., Abdrrabba M. **2016**. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(3):401-412. doi: 10.1111/jpn.12379.
24. Beltrao P., Bork P., Krogan N.J., van Noort V. **2013**. Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Molecular Systems Biology*, 9:714. doi: 10.1002/msb.201304521.
25. Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. **1946**. A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *The Journal of Biological Chemistry*, 164:321-329. doi: 10.1016/0009-8981(67)90230-6
26. Bilodeau J.F., Blanchette S., Gagnon C., Sirard M.A. **2001**. Thiols prevent H_2O_2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2):275-286. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00562-3.
27. Blesbois E. **2007**. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*, 63(2):213-222. doi: 10.1017/S0043933907001419.
28. Blesbois E., Brillard J.P. **2007**. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal: the international journal of animal biosciences*, 1(10):1472-1481. doi: 10.1017/S175173110700081X.
29. Blesbois E., Caffin J.P. **1992**. 'Serum like' albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4°C. *British Poultry Science*, 33(3):663-670. doi: 10.1080/00071669208417504.

30. Blesbois E., Lessire M., Grasseau I., Hallouis, J.M., Hermier D. **1997**. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and on fertilizing ability of fowl semen. *Biology of Reproduction*, 56(5):1216–1220. doi: 10.1095/biolreprod56.5.1216.
31. Bobek S., Sechman A., Wieczorek E., Wronska-Fortuna D., Koziec K., Niezgoda J. **1997**. Reverse 3,3',5'-triiodothyronine (rT3) enhances hyperglycemic and lipemic effects of heat-stress in chickens. Hormone and Metabolic Research, 29(5):252-254. doi: 10.1055/s-2007-979031.
32. Bonato M., Malecki I.A., Rybnik-Trzaskowska P.K., Cornwallis C.K., Cloete S.W. **2014**. Predicting ejaculate quality and libido in male ostriches: Effect of season and age. *Animal Reproduction Science*, 151(1-2):49-55. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.015.
33. Boni R. **2019**. Heat stress, a serious threat to reproductive function in animals and humans. *Molecular Reproduction and Development*, 86(10):1307-1323. doi:10.1002/mrd.23123
34. Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S. **2018**. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 36(3):327-339. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.12.005.
35. Bradshaw W.E., Holzapfel C.M. **2007**. Evolition of animal photoperiodism. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 38:1-25. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110115.
36. Breitbert H., Finkelstein M. **2018**. Actin cytoskeleton and sperm function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(2):372-377. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.001.
37. Brekken R.A., Sage E.H. **2001**. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biology*, 19(8):816-827. doi: 10.1016/s0945-053x(00)00133-5.
38. Buffone M.G., Doncel G.F., Marin Briggiler C.I., Vazquez-Levin M.H., Calamera J.C. **2004**. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. *Human Reproduction*, 19(1):139-146. doi: 10.1093/humrep/deh040.
39. Burrows W.H., Quinn J.P. **1937**. The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry Science*, 16(1):19-24. doi: 10.3382/ps.0160019.

40. Cakan M., Bakirtas H., Aldemir M., Demirel F., Altug U. **2008**. Results of varicocelectomy in patients with isolated teratozoospermia. *Urologia internationalis*, 80(2):172-176. doi: 10.1159/000112609.
41. Carluccio A., Panzani S., Contri A., Bronzo V., Robbe D., Veronesi M.C. **2013**. Influence of season on testicular morphometry and semen characteristics in Martina Franca jackasses. *Theriogenology*, 79(3):502-507. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.11.005.
42. Cecil H.C., Bakst M.R. **1988**. Testosterone concentrations in blood and seminal plasma of turkeys classified as high or low semen producers. *Poultry Science*, 67(10):1461-1464. doi: 10.3382/ps.0671461.
43. Centola G.M., Eberly S. **1999**. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration. *Fertility and Sterility*, 72(5):803-808. doi: 10.1016/s0015-0282(99)00395-7.
44. Cerolini S., Surai P., Maldjian A., Gliozzi T., Noble R. **1997** Lipid composition of semen in different fowl breeders. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 8(3):141–148.
45. Chan C.C., Shui H.A., Wu C.H., Wang C.Y., Sun G.H., Chen H.M., Wu G.J. **2009**. Motility and protein phosphorylation in healthy and asthenozoospermic sperm. *Journal of Proteome Research*, 8(11):5382-5386. doi: 10.1021/pr9003932.
46. Chełmońska B., Kassner J. **2007** Budowa i funkcjonowanie układu rozrodczego samców ptaków domowych oraz ich użytkowanie rozpłodowe w aspekcie sztucznego unasieniania. W: Biologia rozrodu zwierząt 2. Biologiczne uwarunkowania wartości rozrodowej samca (red. J. Strzeżek). *Wydawnictwo UWM*, Olsztyn. 231-260
47. Chen J.J., Genereux J.C., Suh E.H., Vartabedian V.F., Rius B., Qu S., Dendele M.T.A., Kelly J.W., Wiseman R.L. **2016**. Endoplasmic reticulum proteostasis influences the oligomeric state of an amyloidogenic protein secreted from mammalian cells. *Cell Chemical Biology*, 23(10):1282-1293. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.09.001.
48. Cherms F.L. **1968**. Variations in semen quality and the relationship of semen quality to fertility in turkeys. *Poultry Science*, 47(3):746-754. doi: 10.3382/ps.0470746.
49. Chi X., Xiang D., Sha Y., Liang S., Wang Ch. **2022**. Inhibition of human sperm function by an antibody against apolipoprotein A1: A protein located in human spermatozoa. *Andrologia*, 54(4):e14365. doi: 10.1111/and.14365.

50. Chida K., Tsunenaga M., Kasahara K., Kohno Y., Kuroki T. **1990**. Regulation of creatine phosphokinase B activity by protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(1):346-350. doi: 10.1016/s0006-291x(05)81063-0.
51. Chung S.S.W., Wolgemuth D.J. **2004**. Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. *Cytogenetic and genome research*, 105(2-4):189-202. doi: 10.1159/000078189.
52. Ciereszko A., Ottobre J.S., Glogowski J. **2000**. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Animal Reproduction Science*, 64(1-2):89-96. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00194-9.
53. Cockrem J.F. **1995**. Timing of seasonal breeding in birds, with particular reference to New Zealand birds. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(1):1-19. doi: 10.1071/rd9950001.
54. Cohen P. **2002**. The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4(5):E127-130. doi: 10.1038/ncb0502-e127.
55. Dandekar S.P., Parkar G.M. **1999**. Correlation between creatine kinase activity, lipid-peroxidation and water test in male infertility. *Journal of Postgraduate Medicine*, 45(2):42-48.
56. Dawson A., King V.M., Bentley G.E., Ball G.F. **2001**. Photoperiodic control of seasonality in birds. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4):365-380. doi: 10.1177/074873001129002079.
57. Dawson A., Sharp P.J. **2007**. Photorefractoriness in birds--photoperiodic and non-photoperiodic control. *General and Comparative Endocrinology*, 153(1-3):378-384. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.01.043.
58. Druart X., de Graaf S. **2018**. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal Reproduction Science*, 194:33-40. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.061.
59. Domosławska A., Zduńczyk S., Niżański W., Janowski T. **2013**. Assessment of semen quality in infertile dogs using computer-assisted sperm analysis by the Hamilton-Thorne Semen Analyser. *Journal of Veterinary Research*, 57(3):429-432. doi: 10.2478/bvip-2013-0074.
60. Donoghue A.M., Wishart G.J. **2000**. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3):213-232. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00160-3.
61. Douard V., Gassama-Diagne A., Hermier D., Blesbois E. **2004**. Activity of phospholipases A and lysophospholipase in turkey semen and oviducal fluid. *Poultry Science*, 83(8):1385-1393. doi: 10.1093/ps/83.8.1385.

62. Douard V., Hermier D., Blesbois E. **2000** Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biology of Reproduction*, 63(5):1450–1456. doi: 10.1095/biolreprod63.5.1450.
63. Douard V., Hermier D., Labbe C., Magistrini M., Blesbois E. **2005**. Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during *in vitro* storage. *Theriogenology*, 63(1):126-137. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.020.
64. Douard V., Hermier D., Magistrini M., Blesbois E. **2003**. Reproductive period affects lipid composition and quality of fresh and stored spermatozoa in turkeys. *Theriogenology*, 59(3-4):753-764. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01086-5.
65. Dun M.D., Aitken R.J., Nixon B. **2012**. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, 18(4):420-435. doi: 10.1093/humupd/dms009.
66. Duncan M.W., Thompson H.S. **2007**. Proteomics of semen and its constituents. *Proteomics – Clinical Applications*, 1(8):861-875. doi: 10.1002/prca.200700228.
67. Ďuračka M., Petrovičová M., Benko F., Kováčik A., Lukáč N., Kačániová M., Tvrdá E. **2023**. Lohmann Brown rooster semen: intrinsic bacteria and their impact on sperm progressive motility and seminal biochemical parameters—a preliminary study. *Stresses*, 3(2):424-433. doi.org/10.3390/stresses3020031.
68. Dyrda K., Orzołek A., Ner-Kluza J., Wysocki P. **2021**. Influence of the season and region factor on phosphoproteome of stallion epididymal sperm. *Animals*, 11(12):3487. doi: 10.3390/ani11123487.
69. El-Hack M.E., Abdelnour S.A., Swelum A.A., Arif M. **2018**. The application of gene marker-assisted selection and proteomics for the best meat quality criteria and body measurements in Qinchuan cattle breed. *Molecular Biology Reports*, 45(5):1445-1456. doi: 10.1007/s11033-018-4211-y.
70. El Jack M.H., Lake P.E. **1969**. The distribution of the principal inorganic ions in semen from the vas deferens of the domestic fowl and the content of carbon dioxide in the seminal plasma. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 54(3):332–340. doi: 10.1113/expphysiol.1969.sp002031.
71. Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. **1982**. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30(3):279-280. doi: 10.1177/30.3.6174566.

72. Fattah A., Sharafi M., Masoudi R., Shahverdi A., Esmaeili V., Najafi A. **2017**. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, 74:148-153. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.10.009.
73. Faruga A., Jankowski J., **1996**. Indyki – hodowla i użytkowanie. *Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne*, Warszawa.
74. Fernandez-Real J.M., Menendez J.A., Moreno-Navarrete J.M., Blüher M., Vazquez-Martin A., Vázquez M.J., Ortega F., Diéguez C., Diéguez C., Ricart W., Vidal-Puig A. **2010**. Extracellular fatty acid synthase: a possible surrogate biomarker of insulin resistance. *Diabetes*, 59(6):1506-1511. doi: 10.2337/db09-1756.
75. Fetterlof P.M., Rogers B.J. **1990**. Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. *Molecular Reproduction and Development*, 27(4):326-331. doi: 10.1002/mrd.1080270406.
76. Ficarro S., Chertihin O., Westbrook V.A., White F., Jayes F., Kalab P., Marto J.A., Shabanowitz J., Herr J.C., Hunt D.F., Visconti P.E. **2003**. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(13):11579–11589. doi: 10.1074/jbc.M202325200.
77. Finelli R., Darbandi S., Pushparaj P.N., Henkel R., Ko E., Agarwal A. **2021**. In silico sperm proteome analysis to investigate DNA repair mechanisms in varicocele patients. *Frontiers in Endocrinology*, 12:757592. doi: 10.3389/fendo.2021.757592.
78. Flees J., Rajaei-Sharifabadi H., Greene E., Beer E., Hargis B.M., Ellestad L., Porter T., Donoghue A., Bottje W.G., Dridi S. **2017**. Effect of Morinda citrifolia (Noni)-Enriched Diet on Hepatic Heat Shock Protein and Lipid Metabolism-Related Genes in Heat Stressed Broiler Chickens. *Frontiers in Physiology*, 8:919. doi: 10.3389/fphys.2017.00919.
79. Floyd M.H., Tyler N.C. **2011**. Photostimulation of male broiler breeders to different photoperiods. *South African Journal of Animal Science*, 41(2):146-155. doi: 10.4314/sajas.v41i2.71019.
80. Fong V.H., Vieira A. **2013**. Transthyretin aggregates induce production of reactive nitrogen species. *Neurodegenerative Diseases*, 11:42–48. doi: 10.1159/000338153.
81. Fouad A.M., Chen W., Ruan D., Wang S., Xia W.G., Zheng C.T. **2016**. Impact of heat stress on meat, egg quality, immunity and fertility in poultry and nutritional factors that overcome these effects: a review. *International Journal of Poultry Science*, 15(3):81-95.

82. Fraser L., Lecewicz M., Strzeżek J. **2002**. Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Polish Journal of Veterinary Science*, 5(2):85-92.
83. Fréour T., Jean M., Mirallié S., Dubourdieu S., Barrière P. **2010**. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 149(2):186-189. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.12.029.
84. Froman D.P., Thurston R.J. **1981**. Chicken and turkey spermatozoal superoxide dismutase: a comparative study. *Biology of Reproduction*, 24(1):193-200. doi: 10.1095/biolreprod24.1.193.
85. Fu L., An Q., Zhang K., Liu Y., Tong Y., Xu J., Zhou F., Wang X., Guo Y., Lu W., Liang X., Gu Y. **2019**. Quantitative proteomic characterization of human sperm cryopreservation: using data independent acquisition mass spectrometry. *BMC Urology*, 19(1):133. doi: 10.1186/s12894-019-0565-2.
86. Gadadhar S., Bodakuntla S., Natarajan K., Janke C. **2017**. The tubulin code at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(8):1347-1353. doi: 10.1242/jcs.199471.
87. Garasto S., Montesanto A., Corsonello A., Lattanzio F., Fusco S., Passarino G., Giarritta V.P., Corica F. **2017**. Thyroid hormones in extreme longevity. *Mechanizms of Ageing and Development*, 165(Pt B):98-106. doi: 10.1016/j.mad.2017.03.002.
88. Garner D.L., Johnson L.A. **1995**. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53(2):276-284. doi: 10.1095/biolreprod53.2.276.
89. Gaughan J.B., Bonner S.L., Loxton I., Mader T.L. **2013**. Effects of chronic heat stress on plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 91(1):120-129. doi: 10.2527/jas.2012-5294.
90. Giles S., Czuprynski C. **2003**. Novel role for albumin in innate immunity: serum albumin inhibits the growth of Blastomyces dermatitidis yeast form in vitro. *Infection and Immunity*, 71(11):6648-6652. doi: 10.1128/IAI.71.11.6648-6652.2003.
91. Go K.J., Wolf D.P. **1985**. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biology of Reproduction*, 32(1):145-153. doi: 10.1095/biolreprod32.1.145.
92. Goel A. **2021**. Heat stress management in poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(6):1136-1145. doi: 10.1111/jpn.13496.

93. Gomez E., Irvine D.S., Aitken R.J. **1998**. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology*, 21(2):81-94. doi: 10.1046/j.1365-2605.1998.00106.x.
94. Gonçalves C.M., Castro M.A.A., Henriques T., Oliveira M.I., Pinheiro H.C., Oliveira C., Sreenu V.B., Evans E.J., Davis S.J., Moreira A., Carmo A.M. **2009**. Molecular cloning and analysis of SSc5D, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Molecular Immunology*, 46(13):2585-2596. doi.org/10.1016/j.molimm.2009.05.006.
95. Gonzalez-Rivas P.A., Chauhan S.S., Ha M., Fegan N., Dunshea F.R., Warner R.D. **2020**. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat Science*, 162:108025. doi: 10.1016/j.meatsci.2019.108025.
96. Guo Y., Jiang W., Yu W., Niu X., Liu F., Zhou T., Zhang H., Li Y., Zhu H., Zhou Z., Sha J., Guo X., Chen D. **2019**. Proteomics analysis of asthenozoospermia and identification of glucose-6-phosphate isomerase as an important enzyme for sperm motility. *Journal of Proteomics*, 208:103478. doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103478.
97. Guo M., Teng M., Niu L., Liu Q., Huang Q., Hao Q. **2005**. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K^+ channel inhibitor-like fold. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13):12405-12412. doi: 10.1074/jbc.M413566200.
98. Halliwell B., Chirico S. **1993**. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5):715S-724S. doi: 10.1093/ajcn/57.5.715S.
99. Han X., Aslanian A., Yates J.R. **2008**. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5):483-490. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.07.024.
100. Hansen P.J. **2009**. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 364(1534):3341-3350. doi: 10.1098/rstb.2009.0131.
101. He S., Zhao S., Dai S., Liu D., Bokhari S.G. **2015**. Effects of dietary betaine on growth performance, fat deposition and serum lipids in broilers subjected to chronic heat stress. *Animal Science Journal*, 86(10):897-903. doi: 10.1111/asj.12372.
102. Hemmings N., Birkhead T.R., Brillard J.P., Froment P., Briere S. **2015**. Timing associated with oviductal sperm storage and release after artificial insemination in

domestic hens. *Theriogenology*, 83(7):1174-1178 doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.022.

103. Henricks D.M., Kouba A.J., Lackey B.R., Boone W.R., Gray S.L. **1998**. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on sperm motility. *Biology of Reproduction*, 59(2):330-337. doi: 10.1095/biolreprod59.2.330.
104. Hess R.A., Thurston R.J. **1984**. Detection and incidence of yellow turkey semen on commercial breeder farms. *Poultry Science*, 63(10):2084-2086. doi: 10.3382/ps.0632084.
105. Hess R.A., Thurston R.J., Biellier H.V. **1976**. Morphology of the epididymal region and ductus deferens of the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Journal of Anatomy*, 122:241-252.
106. Hess R.A., Thurston R.J., Biellier H.V. **1982**. Morphology of the epididymal region of turkeys producing abnormal yellow semen. *Poultry Science*, 61(3):531-539. doi: 10.3382/ps.0610531.
107. Hinsch K.D., De Pinto V., Aires V.A., Schneider X., Messina A., Hinsch E. **2004**. Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15):15281-15288. doi: 10.1074/jbc.M313433200.
108. Hirsch J., Hansen K.C., Burlingame A.L., Matthay M.A. **2004**. Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1):L1-L23. doi: 10.1152/ajplung.00301.2003.
109. van der Horst C.J., Litjens J.B. **1969**. Occurrence and determination of inositol in the oviducts of turkey and hen. *Nature*, 221(5175):86-87. doi: 10.1038/221086a0.
110. Howarth B. Jr **1983**. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis, epididymis and vas deferens following intramagnal insemination. *Biology of Reproduction*, 28(3):586-590. doi: 10.1095/biolreprod28.3.586.
111. Hunter T. **2014**. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5): a020644. doi: 10.1101/cshperspect.a020644.
112. Iaffaldano N., Di Iorio M., Mannina L., Paventi G., Rosato M.P., Cerolini S., Sobolev A.P. **2018**. Age-dependent changes in metabolic profile of turkey

spermatozoa as assessed by NMR analysis. *PLoS One*, 13(3):e0194219. doi: 10.1371/journal.pone.0194219.

113. Iaffaldano N., Di Iorio M., Miranda M., Zaniboni L., Manchisi A., Cerolini S. **2016**. Cryopreserving turkey semen in straws and nitrogen vapour using DMSO or DMA: effects of cryoprotectant concentration, freezing rate and thawing rate on post-thaw semen quality. *British Poultry Science*, 57(2):264-270. doi: 10.1080/00071668.2016.1148261.
114. Iaffaldano N., Manchisi A., Rosato M.P. **2008**. The preservability of turkey semen quality during liquid storage in relation to strain and age of males. *Animal Reproduction Science*, 109(1-4):266-273. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.024.
115. Inaba K. **2003**. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological Science*, 20(9):1043-1056. doi: 10.2108/zsj.20.1043.
116. Infante M., Armani A., Mammi C., Fabbri A., Caprio M. **2017**. Impact of adrenal steroids on regulation of adipose tissue. *Comprehensive Physiology*, 7(4):1425-1447. doi: 10.1002/cphy.c160037.
117. Intasqui P., Camargo M., Del Giudice P.T., Spaine D.M., Carvalho V.M., Cardozo K.H., Cadenho A.P., Bertolla R.P. **2013a**. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(9):1187-1202. doi: 10.1007/s10815-013-0054-6.
118. Intasqui P., Camargo M., Giudice P.T.D., Spaine D.M., Carvalho V.M., Cardozo K.H.M., Zylbersztejn D.S., Bertolla R.P. **2013b**. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU International, Sexual Medicine*, 112(6):835-843. doi: 10.1111/bju.12233.
119. Intasqui P., Camargo M., Antoniassi M.P., Cedenho A.P., Carvalho V.M., Cardozo K.H.M., Zylbersztejn, D.S., Bertolla R.P. **2016**. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. *Fertility and Sterility*, 105(3): 617-628. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.005.
120. Islam R., Yoon H., Kim B.S., Bae H., Shin H., Kim W.J., Yoon W., Lee Y.S., Woo K.M., Baek J.H., Ryoo H.M. **2017**. Blood-testis barrier integrity depends on Pin1 expression in Sertoli cells. *Scientific Reports*, 7(1):6977. doi: 10.1038/s41598-017-07229-1.

121. Ito T., Yoshizaki N., Tokumoto T., Ono H., Yoshimura T., Tsukada A., Kansaku N., Sasanami T. **2011**. Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. *Endocrionology*, 152(10):3952-3962. doi: 10.1210/en.2011-0237.

122. Izanloo H., Soleimanzadeh A., Bucak M.N., Imani M., Zhandi M. **2021**. The effects of varying concentrations of glutathione and trehalose in improving microscopic and oxidative stress parameters in turkey semen during liquid storage at 5 °C. *Cryobiology*, 101:12-19. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.07.002.

123. Jha K.N., Salicioni A.M., Arcelay E., Chertihin O., Kumari S., Herr J.C., Visconti P.E. **2006**. Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation. *Molecular Human Reproduction*, 12(12):781-789. doi: 10.1093/molehr/gal085.

124. Jones R.C. **1998**. Evolution of the vertebrate epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 53:163-181.

125. Jones R.C., Lin M. **1993**. Spermatogenesis in birds. *Journal of Reproduction of Fertility. Supplement*, 15:233-264

126. Karaca A.G., Parker H.M., Yeatman J.B., McDaniel C.D. **2002**. The effects of heat stress and sperm quality classification on broiler breeder male fertility and semen ion concentrations. *British Poultry Science*, 43(4):621-628. doi: 10.1080/0007166022000004552.

127. Karl J.P., Hatch A.M., Arcidiacono S.M., Pearce S.C., Pantoja-Feliciano I.G., Doherty L.A., Soares J.W. **2018**. Effects of psychological, environmental and physical stressors on the gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 9:2013. doi: 10.3389/fmicb.2018.02013.

128. Kekelidze T., Khait I., Togliatti A., Benzecry J.M., Wieringa B., Holtzman D. **2001**. Altered brain phosphocreatine and ATP regulation when mitochondrial creatine kinase is absent. *Journal of Neuroscience Research*, 66(5):866-872. doi: 10.1002/jnr.10060.

129. Kelso K.A., Cerolini S., Noble R.C., Sparks N.H., Speake B.K. **1996**. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Journal of reproduction and fertility*, 106(2):201-206. doi: 10.1530/jrf.0.1060201.

130. Khan R.U., Laudadio V., Tufarelli V. **2012**. Semen traits and seminal plasma biochemical parameters in white leghorn layer breeders. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2):190-195. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01821.x.

131. Kobayashi T., Miyazaki T., Natori M., Nozawa S. **1991**. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility. Superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction*, 6(7):987-991. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137474.

132. Kodali V.K., Thorpe C. **2010**. Oxidative protein folding and the Quiescin–sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(8):1217–1230. doi.org/10.1089/ars.2010.3098.

133. Kotłowska M., Glogowski J., Dietrich G.J., Kozłowski K., Faruga A., Jankowski J., Ciereszko A., **2005**. Biochemical characteristics and sperm production of turkey semen in relation to strain and age of the males. *Poultry Science*, 84(11):1763-1768. doi: 10.1093/ps/84.11.1763.

134. Kowalczyk A., Łukaszewicz E. **2015**. Simple and effective methods of freezing capercaillie (*Tetrao urogallus L.*) semen. *PLoS One*, 10(1):e0116797. doi: 10.1371/journal.pone.0116797.

135. Koskinen E., Junnila M., Katila T., Soini H. **1989**. A preliminary study on the use of betaine as a cryoprotective agent in deep freezing of stallion semen. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*, 36(2):110-114. doi: 10.1111/j.1439-0442.1989.tb00710.x.

136. Koziorowska-Gilun M., Koziorowski M., Strzeżek J., Fraser L. **2011**. Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract. *Reproductive Biology*, 11(1):37-47. doi: 10.1016/s1642-431x(12)60062-x.

137. Koziorowska-Gilun M., Szurnicka M., Dziekońska A., Kordan W., Giżejewski Z., Filipowicz K. **2016**. Characteristics of antioxidant systems of yellow fraction of red deer's (*Cervus elaphus L.*) semen during the rutting period. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2):248-254. doi: 10.1111/rda.12673.

138. Kumar V., Rani S. **1999**. Light sensitivity of the photoperiodic response system in higher vertebrates: wavelength and intensity effects. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37(11):1053-1064.

139. Kumar A., Sridharn T.B., Rao K.A. **2019**. Role of seminal plasma proteins in effective zygote formation – A success road to pregnancy. *Protein & Peptide Letters*, 26(4):238-250. doi: 10.2174/0929866526666190208112152.

140. Kumari K.N.R., Nath D.N. **2018**. Ameliorative measures to counter heat stress in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 74:117–130. doi: 10.1017/S0043933917001003.

141. Kunzel W.J. **1993**. The search for deep encephalic photoreceptors within the avian brain, using gonadal development as a primary indicator. *Poultry Science*, 72(5):959-967. doi: 10.3382/ps.0720959.

142. Kwon W.S., Rahman M.S., Lee J.S., Kim J., Yoon S.J., Park Y.J., You Y.A., Hwang S., Pang M.G. **2014**. A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa. *BMC Genomics*, 15(1):897. doi: 10.1186/1471-2164-15-897.

143. Labas V., Grasseau I., Cahier K., Gargaros A., Harichaux G., Teixeira-Gomes A.P., Alves S., Bourin M., Gérard N., Blesbois E. **2015**. Qualitative and quantitative peptidomic and proteomic approaches to phenotyping chicken semen. *Journal of Proteomics*, 112:313-335. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.024.

144. Laemmli U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685. doi: 10.1038/227680a0.

145. Lake P.E. **1971**. The male reproduction. W: Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl (red. D.J. Bell, B.M. Freeman), *Academic Press*, New York, NY, USA, 1411-1447

146. Lake P.E., Wishart G.J. **1984**. Comparative physiology of turkey and fowl semen. W: Reproductive Biology of Poultry. (red. F.J. Cunningham, P.E. Lake, D. Hewit) *British Poultry Science*, Harlow, UK, 151–160.

147. de Lamirande E., Gagnon C. **1992a**. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*, 13(5):368–378.

148. de Lamirande E., Gagnon C. **1992b**. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, 13(5):379–386.

149. Lampiao F., Strijdom H., du Plessis S.S. **2006**. Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *International Journal of Andrology*, 29(5):564-567. doi: 10.1111/j.1365-2605.2006.00695.x.

150. Lasota-Moskalewska A., **2005**. Zwierzęta udomowione w dziejach ludzkości. *Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego*, Warszawa

151. Li R., Luo C., Mines M., Zhang J., Fan G.H. **2006**. Chemokine CXCL12 induces binding of ferritin heavy chain to the chemokine receptor CXCR4, alters CXCR4 signaling, and induces phosphorylation and nuclear translocation of ferritin heavy chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(49):37616-37627. doi: 10.1074/jbc.M607266200.

152. Li Y., Sun Y., Ni A., Shi L., Wang P., Isa A.M., Ge P., Jiang L., Fan J., Ma H., Yang G., Chen J. **2020**. Seminal plasma proteome as an indicator of sperm dysfunction and low sperm motility in chickens. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(6):1035-1046. doi: 10.1074/mcp.RA120.002017.

153. Liedel J.L., Guo Y., Yu Y., Shiou S-R., Chen S., Petrof E.O., Hu S., Much M.W., Claud E.C. **2011**. Mother's Milk-Induced Hsp70 Expression preserves intestinal epithelial barrier function in an immature rat pup model. *Pediatric Research*, 69(5 Pt 1):395-400. doi: 10.1203/PDR.0b013e3182114ec9.

154. Lin W., Bonin M., Boden A., Wieduwild R., Murawala P., Wermke M., Andrade H., Bornhäuser M., Zhang Y. **2019**. Peptidyl prolyl cis/trans isomerase activity on the cell surface correlates with extracellular matrix development. *Communications Biology*, 2:58. doi: 10.1038/s42003-019-0315-8.

155. Lin H., Jiao H.C., Buyse J., Decuypere E. **2006**. Strategies for preventing heat stress in Poultry. *World's Poultry Science Journal*, 62(1):71-85. doi: 10.1079/WPS200585

156. Liu Y., Cao X., He Ch., Guo X., Cai H., Aierken A., Hua J., Peng S. **2022**. Effects of ferroptosis on male reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13):7139. doi: 10.3390/ijms23137139.

157. Liu L., Qin D., Wang X., Feng Y., Yang X., Yao J. **2014**. Effect of immune stress on growth performance and energy metabolism in broiler chickens. *Food and Agricultural Immunology*, 26(2):194-203. doi: 10.1080/09540105.2014.882884.

158. Liu B., Wang P., Wang Z., Jia Y., Niu X., Wang W., Zhang W. **2010**. Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(12):719-724. doi: 10.1007/s10815-010-9466-8.

159. Liumbruno G.M. **2008**. Proteomics: applications in transfusion medicine. *Blood Transfusion*, 6(2):70-85. doi: 10.2450/2008.0038-07

160. Long J.A. **2006**. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science*, 85(2):232-236. doi: 10.1093/ps/85.2.232.

161. Long J.A. **2014**. Applied andrology in chickens and turkeys. W: Animal Andrology. Theories and Applications. (red. P.J. Chenoweth, S.P. Lorton) *CABI*, Boston, MA, USA. 197–225.

162. Long J.A., Conn T.L. **2012**. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24 hours. *Poultry Science*, 91(8):1990-1996. doi: 10.3382/ps.2011-02028.

163. Long J.A., Kramer M. **2003**. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Science*, 82(11):1802-1807. doi: 10.1093/ps/82.11.1802.

164. Lu Z., He X., Ma B., Zhang L., Li J., Jiang Y., Zhou G., Gao F. **2018**. Serum metabolomics study of nutrient metabolic variations in chronic heat-stressed broilers. *The British Journal of Nutrition*, 119(7):771-781. doi: 10.1017/S0007114518000247.

165. Lu Z., He X., Ma B., Zhang L., Li J., Jiang Y., Zhou G., Gao F. **2019**. Increased fat synthesis and limited apolipoprotein B cause lipid accumulation in the liver of broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Poultry Science*, 98(9):3695-3704. doi: 10.3382/ps/pez056.

166. Łukaszewicz E. **2012**. Fizjologiczne podstawy rozrodu. W: Hodowla i użytkowanie drobiu (red. J. Jankowski). *Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne*, Warszawa, 183-226.

167. Maibam U., Hooda O.K., Sharma P.S., Upadhyay R.C., Mohanty A.K. **2018**. Differential level of oxidative stress markers in skin tissue of zebu and crossbreed cattle during thermal stress. *Livestock Science*, 207:45-50. doi: 10.1016/j.livsci.2017.11.003.

168. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S. **2002**. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600):1912-1934. doi: 10.1126/science.1075762.

169. Marti E., Mara L., Marti J.I., Muino-Blanco T., Cebrian-Perez J.A. **2007**. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, 67(9):1446-1454. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.03.002.

170. Martin S.C., Ekman P. **1986**. In vitro phosphorylation of serum albumin by two protein kinases: a potential pitfall in protein phosphorylation reactions. *Analytical Biochemistry*, 154(2):395-399. doi: 10.1016/0003-2697(86)90004-7.

171. Martin-Hidalgo D., Serrano R., Zaragoza C., Garcia-Marin L.J., Bragado M.J. **2020**. Human sperm phosphoproteome reveals differential phosphoprotein signatures that regulate human sperm motility. *Journal of Proteomics*, 215:103654. doi: 10.1016/j.jprot.2020.103654.

172. Marzoni M., Castillo A., Sagona S., Citti L., Rocchiccioli S., Romboli I., Felicioli A. **2013**. A proteomic approach to identify seminal plasma proteins in roosters (*Gallus gallus domesticus*). *Animal Reproduction Science*, 140(3-4):216-223 doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.06.009.

173. Mason I.J., Taylor A., Williams J.G., Sage H., Hogan B.L. **1986**. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial "culture shock" glycoprotein. *The EMBO Journal*, 5(7):1465-1472. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04383.x.

174. Masoudi R., Sharafi M., Pourazadi L. **2019**. Improvement of rooster semen quality using coenzyme Q10 during cooling storage in the Lake extender. *Cryobiology*, 88:87-91. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.03.003.

175. Matsuzaki M., Mizushima S., Dohra H., Sasanami T. **2020**. Expression of transferrin and albumin in the sperm-storage tubules of japanese quail and their possible involvement in long-term sperm storage. *The Journal of Poultry Science*, 57(1):88-96. doi: 10.2141/jpsa.0190049.

176. Matsuzaki M., Sasanami T. **2017**. Sperm Storage in the Female Reproductive Tract: A Conserved Reproductive Strategy for Better Fertilization Success. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1001:173-186. doi: 10.1007/978-981-10-3975-1_11.

177. Matsuzaki M., Sasanami T. **2022**. Sperm motility regulation in male and female bird genital tracts. *The Journal of Poultry Science*, 59(1):1–7. doi: 10.2141/jpsa.0200105.

178. McDermott J.P., Sánchez G., Chennathukuzhi V., Blanco G. **2012**. Green fluorescence protein driven by the Na, K-ATPase α4 isoform promoter is expressed only in male germ cells of mouse testis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(12):1313-1325. doi: 10.1007/s10815-012-9876x.

179. Melesse A., Maak S., Schmidt R., von Lengerken G. **2011**. Effect of long-term heat stress on key enzyme activities and T3 levels in commercial layer hens. *International Journal of Livestock Production*, 2(7):107-116.

180. Mendonca T., Cadby A.J., Hemmings N. **2019**. Sperm gatekeeping: 3D imaging reveals a constricted entrance to zebra finch sperm storage tubules. *Biophysical Journal*, 117(11):2180-2187. doi: 10.1016/j.bpj.2019.10.038.

181. Mereuţă I., Buzan V., Boronciuc G., Balan I., Cazacov I., Bucarciuc M., Roşca N. **2015**. The influence of high temperature on the protein fractions of bull semen. W:Scientific Papers Series D. Animal Science, Volume LVIII, București, Rumunia, 17-18 września 2015, 213-216.

182. Meseguer M., Martínez-Conejero J.A., Muriel L., Pellicer A., Remohí J., Garrido N. **2007**. The human sperm glutathione system: a key role in male fertility and successful cryopreservation. *Drug Metabolism Letters*, 1(2):121-126. doi: 10.2174/187231207780363633.

183. Min Y., Sun T., Niu Z., Liu F. **2016**. Vitamin C and vitamin E supplementation alleviates oxidative stress induced by dexamethasone and improves fertility of breeder roosters. *Animal Reproduction Science*, 171:1-6. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.04.005.

184. Mitulovic G., Mechtler K. **2006**. HPLC techniques for proteomics analysis--a short overview of latest developments. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 5(4):249-260. doi: 10.1093/bfgp/ell034.

185. Munuce M.J., Marini P.E., Teijeiro J.M. **2019**. Expression profile and distribution of Annexin A1, A2 and A5 in human semen. *Andrologia*, 51(2):e13224. doi: 10.1111/and.13224.

186. Murase T., Imaeda N., Yamada H., Miyazawa K. **2007**. Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium Ionophore A23187 in Large White boars. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4):853-865. doi: 10.1262/jrd.19026.

187. Nasrallah F., Hammami M.B., Omar S., Aribia H.B., Sanhaji H., Feki M. **2020**. Semen creatine and creatine kinase activity as an indicator of sperm quality. *Clinical Laboratory*, 66(9). doi: 10.7754/Clin.Lab.2020.191248.

188. Nawab A., Ibtisham F., Li G., Kieser B., Wu J., Liu W., Zhao Y., Nawab Y., Li K., Xiao M., An L. **2018**. Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. *Journal of Thermal Biology*, 78:131-139. doi: 10.1016/j.jtherbio.2018.08.010.

189. Naz R.K. **1999**. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 60(6):1402-1409. doi: 10.1095/biolreprod60.6.1402.

190. Nichi M., Bols P.E.J., Züge R.M., Barnabe V.H., Goovaerts I.G.F., Barnabe R.C., Cortada C.N.M. **2006**. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, 66(4):822–828.

191. Nicholls T.J., Goldsmith A.R., Dawson A. **1988**. Photorefractoriness in birds and comparison with mammals. *Physiological Reviews*, 68(1):133-176. doi: 10.1152/physrev.1988.68.1.133.

192. Nixon B., Ecroyd H., Dacheux J.L., Dacheux F., Labas V., Johnston S.D., Jones R.C. **2016**. Formation and dissociation of sperm bundles in monotremes. *Biology of Reproduction*, 95(4):91. doi: 10.1095/biolreprod.116.140491.

193. Nixon B., Ewen K.A., Krivanek K.M., Clulow J., Kidd G., Ecroyd H., Jones R.C. **2014**. Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). *Reproduction*, 147(3):265-277. doi: 10.1530/REP-13-0566.

194. Obidi J., Onyeanusi B., Ayo J., Rekwot P., Abdullahi S. **2008**. Effect of timing of artificial insemination on fertility and hatchability of Shikabrown breeder hens. *International Journal of Poultry Science*, 7(12):1224–1226. doi: 10.3923/ijps.2008.1224.1226.

195. O'Flaherty C. **2018**. Peroxiredoxin 6: The Protector of Male Fertility. *Antioxidants*, 7(12):173. doi: 10.3390/antiox7120173.

196. Orzołek A., Rafalska K.T., Otowska W.A., Kordan W., Korzekwa A.J., Kozłowski K. **2021**. Influence of zinc and manganese nanoparticles on selected parameters of turkey spermatozoa stored in a liquid state at 4 °C. *Animals*, 11(11):3289. doi: 10.3390/ani11113289.

197. Ozkosem B., Feinstein S.I., Fisher A.B., O'Flaherty C. **2016**. Absence of peroxiredoxin 6 amplifies the effect of oxidant stress on mobility and SCSA/CMA3 defined chromatin quality and impairs fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 94(3):68. doi: 10.1095/biolreprod.115.137646.

198. Palmer A.K., Fraga D., Edmiston P.L. **2008**. Regulation of creatinekinase activity by phosphorylation of serine-199 by AMP-activated kinase. *The Faseb Journal*, 22(S1). doi.org/10.1096/fasebj.22.1_supplement.1012.10.

199. Pan J.Q., Tan X., Li J.C., Sun W.D., Wang X.L. **2005**. Effects of early feed restriction and cold temperature on lipid peroxidation, pulmonary vascular remodelling and ascites morbidity in broilers under normal and cold temperature. *British Poultry Science*, 46(3):374-381. doi: 10.1080/00071660500098152.

200. Pandey A.K., Ganguly H.K., Sinha S.K., Daniels K.E., Yap G.P.A., Patel S., Zondlo N.J. **2020**. An inherent structural difference between serine and threonine phosphorylation: phosphothreonine prefers an ordered, compact, cyclic conformation. *bioRxiv – The preprint server for biology*, doi: 10.1101/2020.02.29.971382.

201. Panner Selvam M.K., Agarwal A., Sharma R., Samanta L., Gupta S., Dias T.R., Martins A.D. **2021**. Protein fingerprinting of seminal plasma reveals dysregulation of exosome-associated proteins in infertile men with unilateral varicocele. *The World Journal of Men's Health*, 39(2):324-337. doi: 10.5534/wjmh.180108.

202. Pardyak L., Kaminska A., Brzoskwinia M., Hejmej A., Kotula-Balak M., Jankowski J., Ciereszko A., Bilinska B. **2018**. Differences in aromatase expression and steroid hormone concentrations in the reproductive tissues of male domestic turkeys (*Meleagris gallopavo*) with white and yellow semen. *British Poultry Science*, 59(5):591-603. doi: 10.1080/00071668.2018.1483576.

203. Parte P.P., Rao P., Redij S., Lobo V., D'Souza S.J., Gajbhiye R., Kulkarni V. **2012**. Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC-MS(E)) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia. *Journal of Proteomics*, 75(18):5861-5871. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.003.

204. Partyka A., Łukaszewicz E., Niżański W. **2012**. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science*, 134(3-4):184-190. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.07.007.

205. Partyka A., Niżański W., Bratkowska M., Maślikowski P. **2015**. Effects of N-acetyl-L-cysteine and catalase on the viability and motility of chicken sperm during liquid storage. *Reproductive Biology*, 15(2):126-129. doi: 10.1016/j.repbio.2015.03.001.

206. Paventi G., Di Iorio M., Rusco G., Sobolev A.P., Cerolini S., Antenucci E., Spano M., Mannina L., Iaffaldano N. **2022**. The effect of semen cryopreservation process on metabolomic profiles of turkey sperm as assessed by NMR analysis. *Biology*, 11(5):642. doi: 10.3390/biology11050642.

207. Paventi G., Lessard C., Bailey J.L., Passarella S. **2015**. In boar sperm capacitation L-lactate and succinate, but not pyruvate and citrate, contribute to the mitochondrial membrane potential increase as monitored via safranine O fluorescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(3):257-262. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.128.

208. Pei Y., Wu Y., Qin Y. **2012**. Effects of chronic heat stress on the expressions of heat shock proteins 60, 70, 90, A2, and HSC70 in the rabbit testis. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1):81-87. doi: 10.1007/s12192-011-0287-1.

209. Peláez J., Long J.A. **2007**. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: I. Identification and distribution of carbohydrate residues using flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Journal of Andrology*, 28(2):342-352. doi: 10.2164/jandrol.106.001073.

210. Pereira B.C., Bocková M., Santos R.F., Santos A.M., de Araújo M.M., Oliveira L., Homola J., Carmo A.M. **2016**. The Scavenger receptor SSc5D physically interacts with bacteria through the SRCR-containing N-terminal domain. *Frontiers in Immunology*, 7:416. doi: 10.3389/fimmu.2016.00416

211. Pereira Silva G., Grangeiro V.P.X., Oliveira C.F.D., Neto F.L., Barroso D.H. **2021**. α1-Acid glycoprotein and seminal parameter in chronic hemodialysis patients. *Urologia*, 88(1):46-49. doi: 10.1177/0391560319899842.

212. Pilane C.M., Mapeka M.H. **2021**. The response of cockerel semen kinematic parameters LIN, STR, WOB, ALH and BCF to induced oxidative stress. *Open Journal of Animal Sciences*, 11(2):292-303. doi: 10.4236/ojas.2021.112022.

213. Płodzich A. **2013**. Proteomika i jej zastosowanie w wybranych jednostkach chorobowych. *Journal of Transfusion Medicine*, 6(2):48-59.

214. Poulsen H., Morth P., Egebjerg J., Nissen P. **2010**. Phosphorylation of the Na^+,K^+-ATPase and the H^+,K^+-ATPase. *FEBS Letters*, 584(12):2589-2595. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.035.

215. Prabakar G., Gopi M., Kolluri G., Rokade J.J., Pavulraj S., Pearlin B.V., Sudamrao Khillare G., Madhupriya V., Singh Tyagi J., Mohan J. **2022**. Seasonal variations on semen quality attributes in turkey and egg type chicken male breeders. *International Journal of Biometeorology*, 66(8):1547-1560. doi: 10.1007/s00484-022-02299-x.

216. Rahman M.B., Schellander K., Luceño N.L., Van Soom A. **2018**. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. *Theriogenology*, 113:102-112. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.02.012.

217. Rao B., Soufir J.C., Martin M., David G. **1989**. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to mid piece abnormalities and motility. *Gamete Research*, 24(2):127-134. doi: 10.1002/mrd.1120240202.

218. Renaudeau D., Collin A., Yahav S., de Basilio V., Gourdine J.L., Collier R.J. **2012**. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 6(5):707-728. doi: 10.1017/S1751731111002448.

219. Reyes-Miguel T., Roa-Espitia A.L., Baltiérrez-Hoyos R., Hernández-González E.O. **2020**. CDC42 drives RHOA activity and actin polymerization during capacitation. *Reproduction*,160(3):393-404. doi:10.1530/REP-19-0577.

220. Richardson S.J., Bradley A.J., Duan W., Wettenhall R.E., Harms P.J., Babon J.J., Southwell B.R. **1994**. Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins. *The American Journal of Physiology*, 266(4 Pt 2):R1359-1370. doi: 10.1152/ajpregu.1994.266.4.R1359.

221. Richburg J.H., Myers J.L., Bratton S.B. **2014**. The role of E3 ligases in the ubiquitin-dependent regulation of spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 30:27-35. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.001.

222. Richter K., Haslbeck M., Buchner J. **2010**. The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40(2):253-266. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.006.

223. Ríos S.R., Lamarche F., Cottet-Rousselle C., Klaus A., Tuerk R., Thali R., Auchli Y., Brunisholz R., Neumann D., Barret L., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. **2014**. Regulation of brain-type creatine kinase by AMP-activated protein kinase: interaction, phosphorylation and ER localization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(8):1271-1283. doi: 10.1016/j.bbabio.2014.03.020.

224. Rodríguez-Martínez H., Kvist U., Ernerudh J., Sanz L., Calvete J.J. **2011**. Seminal plasma proteins: What role do they play? *Amercian Journal of Reproductive Immunology*, 66(1):11-22. doi: 10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x.

225. Rodríguez-Martínez H., Saravia F., Wallagren M., Martinez E.A., Sanz L., Roca J., Vazqueaz J.M., Calvete J.J. **2010**. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *Journal of Reproductive Immunology*, 84(1):57-65. doi: 10.1016/j.jri.2009.10.007.

226. Rosato M.P., Cinone M., Meluzzi A., Manchisi A., Iaffaldano N. **2006**. Changes on the quality characteristics of stored semen during reproductive period of Hybrid

toms. W: XII European Poultry Conference. *World's Poultry Science Journal*, 62:538.

227. Rostagno M.H. **2020**. Effects of heat stress on the gut health of poultry. *Journal of Animal Science*, 98(4):skaa090. doi: 10.1093/jas/skaa090.

228. Rosyada Z.N.A., Ulum M.F., Tumbelaka L.I.T.A., Solihin D.D., Purwantara B., Memili E. **2022**. Implications of sperm heat shock protein 70-2 in bull fertility. *Veterinary World*, 15(6):1456–1466. doi: 10.14202/vetworld.2022.1456-1466.

229. Rowe M., Whittington E., Borziak K., Ravinet M., Eroukhmanoff F., Sætre G. P., Dorus S. **2020**. Molecular diversification of the seminal fluid proteome in a recently diverged Passerine species pair. *Molecular Biology and Evolution*, 37(2):488–506. doi: 10.1093/molbev/msz235

230. Saeki Y., Brown K.L. **1962**. Effect of abnormal spermatozoa on fertility and hatchability in the turkey. *Poultry Science*, 41:1096-1100. doi: 10.3382/ps.0411096.

231. Sage H., Johnson C., Bornstein P. **1984**. Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(6):3993-4007.

232. Samanta L., Parida R., Dias T.R., Agarwal A. **2018**. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1):41. doi: 10.1186/s12958-018-0358-6.

233. Sankaranarayanan S., Llera-Moya M., Drazul-Schrader D., Phillips M.C., Kellner-Weibel G., Rothblat G.H. **2013**. Serum albumin acts as a shuttle to enhance cholesterol efflux from cells. *Journal of Lipid Research*, 54(3):671–676. doi: 10.1194/jlr.M031336.

234. Santiago-Moreno J., Bernal B., Castaño C., Toledano-Díaz A., Gil G., Woelders H., Blesbois E. **2019**. Seminal Plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLoS One*, 14(1): e0209910. doi: 10.1371/journal.pone.0209910.

235. Santiago-Moreno J., Blesbois E. **2020**. Functional aspects of seminal plasma in bird reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16):5664. doi: 10.3390/ijms21165664.

236. Santiago-Moreno J., Esteso M.C., Villaverde-Morcillo S., Toledano-Déaz A., Castaño C., Velázquez R., López-Sebastián A., Goya A.L., Martinez J.G. **2016**. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete

characterization and reproduction technologies. *Asian Journal of Andrology*, 18(6):882-888. doi: 10.4103/1008-682X.188660.

237. Schlattner U., Tokarska-Schlattner M., Wallimann T. **2006**. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(2):164-180. doi: 10.1016/j.bbadis.2005.09.004.
238. Schroeder B., Steen T.V., Espinoza I., Venkatapoorna Ch.M.K., Hu Z., Silva F.M., Regan K., Cuyàs E., Meng X.W., Verdura S., Arbusà A., Schneider P.A., Flatten K.S., Kemble G., Montero J., Kaufmann S.H., Menendez J.A., Lupu R. **2021**. Fatty acid synthase (FASN) regulates the mitochondrial priming of cancer cells. *Cell Death & Disease*, 12(11):977. doi: 10.1038/s41419-021-04262-x.
239. Serrano R., Garcia-Marin L.J., Bragado M.J. **2022**. Sperm phosphoproteome: unraveling male infertility. *Biology*, 11(5):659. doi:10.3390/biology11050659.
240. Setchell B.P. **1998**. The parkes lecture heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 114(2):179–194. doi: 10.1530/jrf.0.1140179.
241. Sexton T.J. **1974**. Oxidative and glycolytic activity of chicken and turkey spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 48(1):59-65. doi: 10.1016/0305-0491(74)90042-x.
242. Sexton T.J. **1976**. Studies on the dilution of turkey semen. *British Poultry Science*, 17(2):179-184. doi: 10.1080/00071667608416264.
243. Shan S., Xu F., Hirschfeld M., Brenig B. **2021**. Sperm lipid markers of male fertility in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16):8767. doi.org/10.3390/ijms22168767.
244. Siva A.B., Kameshwari D.B., Singh V., Pavani K., Sundaram C.S., Rangaraj N., Deenadayal M., Shivaji S. **2010**. Proteomics-based study on asthenozoospermia: Differential expression of proteasome alpha complex. *Molecular Human Reproduction*, 16(7):452-462. doi: 10.1093/molehr/gaq009.
245. Slanina T., Miškeje M., Tirpák F., Błaszczyk M., Formicki G., Massányi P. **2018**. Caffeine strongly improves motility parameters of turkey spermatozoa with no effect on cell viability. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(1):137-150. doi: 10.1556/004.2018.013.
246. Słowińska M., Hejmej A., Bukowska J., Liszewska E., Bilińska B., Hliwa P., Kozłowkski K., Jankowski J., Ciereszko A. **2019**. Expression and secretion of albumin in male turkey (*Meleagris gallopavo*) reproductive tract in relation to yellow semen syndrome. *Poultry Science*, 98(4):1872-1882. doi: 10.3382/ps/pey490.

247. Słowińska M., Jankowski J., Dietrich G.J., Karol H., Liszewska E., Glogowski J., Kozłowski K., Sartowska K., Ciereszko A. **2011**. Effect of organic and irorganic forms of selenium in diets on turkey semen quality. *Poultry Science*, 90(1):181-190. doi: 10.3382/ps.2010-00956.

248. Słowińska M., Kozłowski K., Jankowski J., Ciereszko A. **2015**. Proteomic analysis of white and yellow seminal plasma in turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Journal of Animal Science*, 93:2785-2795. doi: 10.2527/jas2015-8912.

249. Słowińska M., Nynca J., Arnold G.J., Fröhlich T., Jankowski J., Kozłowski K., Mostek A., Ciereszko A. **2017**. Proteomic identification of turkey (*Meleagris gallopavo*) seminal plasma proteins. *Poultry Science*, 96(9):3422-3435. doi: 10.3382/ps/pex132.

250. Słowińska M., Pardyak L., Liszewska E., Judycka S., Bukowska J., Dietrich M.A., Paukszto Ł., Jastrzębski J., Kozłowski K., Kowalczyk A., Jankowski J., Bilińska B., Ciereszko A., **2021**. Characterization and biological role of cysteine-rich venom protein belonging to CRISPs form turkey seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 104(6):1302-1321. doi: 10.1093/biolre/ioab032.

251. Słowińska M., Paukszto Ł., Jastrzębski J.P., Bukowska J., Kozłowski K., Jankowski J., Ciereszko A. **2020**. Transcriptome analysis of turkey (*Meleagris gallopavo*) reproductive tract revealed key pathways regulating spermatogenesis and post-testicular sperm maturation. *Poultry Science*, 99(11):6094-6118. doi: 10.1016/j.psj.2020.07.031

252. Słowińska M., Sallem H., Clench M.R., Ciereszko A. **2018**. Metabolomic analysis of white and yellow seminal plasma in turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Poultry Science*, 97(3):1059-1065. doi: 10.3382/ps/pex366.

253. Sobierajska K., Ciszewski W.M., Wawro M.E., Wieczorek-Szukała K., Boncela J., Papiewska-Pająk I., Niewiarowska J., Kowalska M.A. **2019**. TUBB4B downregulation is critical for increasing migration of metastatic colon cancer cells. *Cells*, 8(8):810. doi: 10.3390/cells8080810.

254. Somanath P.R., Jack S.L., Vijayaraghavan S. **2013**. Changes in sperm glycogen synthase kinase-3 serine phosphorylation and activity accompany motility initiation and stimulation. *Journal of Andrology*, 25(4):605–617. doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02831.x.

255. St-Pierre N., Cobanov B., Schnitkey G. **2003**. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*, 86(E52–E77). doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5.

256. Strzeżek R., Szemplińska K., Filipowicz K., Kordan W. **2015**. Semen characteristics and selected biochemical markers of canine seminal plasma in various seasons of the year. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(1):13–18. doi: 10.1515/pjvs-2015-0002.

257. Suliman Y., Becker F., Tuchscherer A., Wimmers K. **2020**. Seasonal variations in quantitative and qualitative sperm characteristics in fertile and subfertile stallions. *Archives Animal Breeding*, 63(1):145-154. doi: 10.5194/aab-63-145-2020.

258. Surai P.F. **2016**. Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. *Journal of Animal Research and Nutrition*, 1(8):1-17. doi:10.21767/2572-5459.100008.

259. Surai P.F., Blesbois E., Grasseau I., Chalah T., Brillard J.P., Wishart G.J., Cerolini S, Sparks N.H. **1998a**. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 120(3):527-533. doi: 10.1016/s0305-0491(98)10039-1.

260. Surai P.F., Brillard J.P., Speake B.K., Blesbois E., Seigneurin F., Sparks N.H. **2000a**. Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology*, 53(5):1025-1039. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00249-1.

261. Surai P.F., Cerolini S., Wishart G.J., Speake B.K., Noble R.C., Sparks N.H.C. **1998b.** Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 9(1):11–23.

262. Surai P.F., Fujihara N., Speake B.K., Brillard J-P., Wishart G.J., Sparks N.H.C. **2001**. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen – review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(7): 1024-1050. doi: 10.5713/ajas.2001.1024.

263. Surai P.F., Kochish I.I., Romanov M.N., Griffin D.K. **2019**. Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: the case of vitamin E. *Poultry Science*, 98(9):4030-4041. doi: 10.3382/ps/pez072.

264. Surai P.F., Royle N.J., Sparks N.H. **2000b**. Fatty acid, carotenoid and vitamin A composition of tissues of free living gulls. *Comparative Biochemistry and*

Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology, 126(3):387-396. doi: 10.1016/s1095-6433(00)00220-8.

265. Sutovsky P., Moreno R., Ramalho-Santos J., Dominko T., Thompson W.E., Schatten G. **2001**. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science*, 114(9):1665–1675. doi: 10.1242/jcs.114.9.1665.
266. Ścibor D., Czczot H. **2006**. Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 60:170-180.
267. Tabatabaei S., Aghaei A. **2012**. Effect of L-carnitine on sperm quality during liquid storage of chicken semen. *Comparative Clinical Pathology*, 21:711–717. doi: 10.1007/s00580-010-1163-6.
268. Tang J., Chen Z. **2015**. The protective effect of γ-aminobutyric acid on the development of immune function in chickens under heat stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(4):768-777. doi: 10.1111/jpn.12385.
269. Teeter R.G., Smith M.O., Owens F.N., Arp S.C., Sangiah S., Breazile J.E. **1985**. Chronic heat stress and respiratory alkalosis: occurrence and treatment in broiler chicks. *Poultry Science*, 64(6):1060-1064. doi: 10.3382/ps.0641060.
270. Terazaki H., Ando Y., Suhr O., Ohlsson P., Obayashi K., Yamashita T., Yoshimatsu S., Suga M., Uchino M., Ando M. **1998**. Post-translational modification of transthyretin in plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(1):26-30. doi: 10.1006/bbrc.1998.9097.
271. Thélie A., Bailliard A., Seigneurin F., Zerjal T., Tixier-Boichard M., Blesbois E. **2019**. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poultry Science*, 98(1):447-455. doi: 10.3382/ps/pey360.
272. Thomas C.A., Garner D.L., DeJarnette J.M., Marshall C.E. **1998**. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 58(3):786-793. doi: 10.1095/biolreprod58.3.786.
273. Thundathil J.C., Rajamanickam G.D., Kastelic J.P., Newton L.D. **2012**. The effects of increased testicular temperature on testis-specific ssoform of Na^+/K^+-ATPase in sperm and its role in spermatogenesis and sperm function. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4):170–177. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02072.x.
274. Thurston R.J., Hess R.A., Biellier H.V., Adldinger H.K., Solorzano R.F. **1975**. Ultrastructural studies of semen abnormalities and herpesvirus associated with

cultured testicular cells from domestic turkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*, 45(2):235-241. doi: 10.1530/jrf.0.0450235.

275. Thurston R.J., Hess R.A., Froman D.P. **1982**. Elevated seminal plasma protein: a characteristic of yellow turkey semen. *Poultry Science*, 61:1905-1911 doi: 10.3382/ps.0611905.

276. Thurston R.J., Hess R.A., Korn N. **1992**. Seminal plasma protein concentration as a predictor of fertility and hatchability in large white domestic turkeys. *Journal of Applied Poultry Research,* 1(3):335-338. doi: 10.1093/japr/1.3.335.

277. Thurston R.J., Korn N. **1997**. Semen quality in the domestic turkey: the yellow semen syndrome. *Avian Poultry Biology Reviews*, 8:109–121.

278. Trzcińska M., Bryła M. **2015**. Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(3):473-480. doi: 10.1515/pjvs-2015-0062.

279. Türk G., Çeribaşı A.O., Şimşek Ü.G., Çeribaşı S., Güvenç M., Kaya Ş.Ö., Çiftçi M., Sönmez M., Yüce A., Bayrakdar A. **2016**. Dietary rosemary oil alleviates heat stress-induced structural and functional damage through lipid peroxidation in the testes of growing Japanese quail. *Animal Reproduction Science*, 164:133-143. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.11.021.

280. Unnikrishnan V., Kastelic J.P., Thundathil J.C. **2021**. Ouabain-induced activation of phospholipase C zeta and its contributions to bovine sperm capacitation. *Cell and Tissue Research*, 385(3):785-801. doi: 10.1007/s00441-021-03455-2.

281. Vasisth R., Mukesh M., Sodhi M., Kataria R.S. **2022**. Semen quality biomarkers for improvement of production in livestock. *Advances in Animal Experimentation and Modeling*, 7:77-84. doi: 10.1016/B978-0-323-90583-1.00004-0

282. Vazquez-Levin M.H., Furlong L.I., Veaute C.M., Ghiringhelli P.D. **2005**. An overview of the proacrosin/acrosin system in human spermatozoa. *Treballs de la SCB*, 56:59-74. doi: 10.2436/20.1501.02.6.

283. Verstegen J., Iguer–Ouada M., Onclin K. **2002**. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1):149-179. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00664-1.

284. Visconti P.E., Galantino-Homer H., Moore G.D., Bailey J.L., Ning X., Fornes M., Kopf G.S. **1998**. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 19(2):242–248.

285. Visconti P.E., Westbrook V.A., Chertihin O., Demarco I., Sleight S., Diekman A.B. **2002**. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology*, 53(1-2):133-150. doi: 10.1016/s0165-0378(01)00103-6.

286. Vlastaridis P., Kyriakidou P., Chaliotis A., Van de Peer Y., Oliver S.G., Amoutzias G.D. **2017**. Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes. *GigaScience*, 6(2):1-11. doi: 10.1093/gigascience/giw015.

287. Wang T., Cao B., Cai Y., Chen S., Wang B., Yuan Y., Zhang Q. **2023**. Plcz1 Deficiency Decreased Fertility in Male Mice Which Is Associated with Sperm Quality Decline and Abnormal Cytoskeleton in Epididymis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1):314. doi: 10.3390/ijms24010314

288. Wang Z., Grange M., Wagner T., Kho A.L., Gautel M., Rausner S. **2021a**. The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. *Cell*, 184(8):2135-2150.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.047.

289. Wang Y.C., Peterson S.E., Loring J.F. **2014**. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Research*, 24(2):143-160. doi: 10.1038/cr.2013.151.

290. Wang X., Wei Z., Xue Ch. **2021c**. The past and future of ovotransferrin: Physicochemical properties, assembly and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 116:47–62. doi:10.1016/j.tifs.2021.07.003.

291. Wang T.E., Yeh L.Y., Lee R.K.K., Lu Ch.H., Yang T.H., Kuo Y.W., Joshi R., Tsai P.S., Li S.H. **2021b**. Secretory mouse quiescin sulfhydryl oxidase 1 aggregates defected human and mouse spermatozoa in vitro and in vivo. *iScience*, 24(10):103167. doi: 10.1016/j.isci.2021.103167.

292. Wasilewska K., Fraser L. **2017**. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. *Animal reproduction Science*, 185:161-173. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.08.016.

293. Wasti S., Sah N., Mishra B. **2020**. Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. *Animals*, 10(8):1266. doi: 10.3390/ani10081266.

294. White I.G., Lincoln G.J. **1960**. The yellow pigmentation of bull semen and its content of riboflavin, niacin, thiamine and related compounds. *The Biochemical Journal*, 76(2):301-306. doi: 10.1042/bj0760301.

295. Wishart G.J. **1985**. Quantitation of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *British Poultry Science*, 26(3):375-380. doi: 10.1080/00071668508416825.

296. Xing S., Wang X., Diao H., Zhang M., Zhou Y., Feng J. **2019**. Changes in the cecal microbiota of laying hens during heat stress is mainly associated with reduced feed intake. *Poultry Science*, 98(11):5257-5264. doi: 10.3382/ps/pez440.

297. Xu Y., Han Q., Ma Ch., Wang Y., Zhang P., Li C., Cheng X., Xu H. **2021**. Comparative proteomics and phosphoproteomics analysis reveal the possible breed difference in Yorkshire and Duroc boar spermatozoa. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:652809. doi: 10.3389/fcell.2021.652809.

298. Xu Q.L., Kang B., Jiang D.M. **2016**. The mechanism of ferritin mediated apoptosis. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1213–1218.

299. Xu Y., Lai X., Li Z., Zhang X., Luo Q. **2018**. Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. *Poultry Science*, 97(11):4073-4082. doi: 10.3382/ps/pey256.

300. Yahav, S. **2015**. Regulation of body temperature: Strategies and mechanisms. W: Sturkie's Avian Physiology (red. C.G. Scanes), *Elsevier*, Amsterdam, The Netherlands, 869–905.

301. Yalak G., Shiu J.Y., Schoen I., Mitsi M., Vogel V. **2019**. Phosphorylated fibronectin enhances cell attachment and upregulates mechanical cell functions. *PLoS One*, 14(7):e0218893. doi: 10.1371/journal.pone.0218893.

302. Yan Q., Sage E.H. **1999**. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(12):1495-1506. doi: 10.1177/002215549904701201.

303. Yang L., Tan G.Y., Fu Y.Q., Feng J.H., Zhang M.H. **2010**. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, RFT production and lipid peroxidation in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology*, 151(2):204-208. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.10.010.

304. Yuan L., Lin H., Jiang K.J., Jiao H.C., Song Z.G. **2008**. Corticosterone administration and high-energy feed results in enhanced fat accumulation and insulin resistance in broiler chickens. *British Poultry Science*, 49(4):487-495. doi: 10.1080/00071660802251731.

305. Yuan Z., Liu W., Hammes C.G. **1988**. Molecular cloning and sequencing of DNA complementary to chicken liver fatty acid synthase mRNA. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(17):6328-6331. doi: 10.1073/pnas.85.17.6328.
306. Yunianto V.D., Hayashi K., Kaneda S., Ohtsuka A., Tomita Y. **1997**. Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. *The British Journal of Nutrition*, 77(6):897-909. doi: 10.1079/bjn19970088.
307. Zaniboni L., Cerolini S. **2009**. Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 112(1-2):51-65 doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.04.002.
308. Zeman M., Kosutzký J., Bobáková E. **1986**. Testosterone concentration in the seminal plasma of cocks. *British Poultry Science*, 27(2):261-266. doi: 10.1080/00071668608416879.
309. Zhai W., Neuman S.L., Latour M.A., Hester P.Y. **2007**. The effect of dietary L-carnitine on semen traits of White Leghorns. *Poultry Science*, 86(10):2228-2235. doi: 10.1093/ps/86.10.2228.
310. Zhang H., Limphong P., Pieper J., Liu Q., Rodesch C.K., Christians E., Benjamin I.J. **2012**. Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 26(4):1442-1451. doi: 10.1096/fj.11-199869.
311. Zmrhal V., Lichovníková M., Hampel D. **2018**. The effect of phytogenic additive on behavior during mild-moderate heat stress in broilers. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunesis*, 66(4):939-944 doi: 10.11118/actaun201866040939
312. http://bioinformatics.sdstate.edu/go/ (dostęp: 01.06.2023 r.)
313. https://www.iucnredlist.org/species/22679525/132051953 (dostęp: 12.05.2023 r.)
314. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez (dostęp: 15.06.2023 r.)
315. https://www.phosphosite.org (dostęp: 15.05.2023 r.)
316. http://string-db.org (dostęp: 17.06.2023 r.)
317. http://www.uniprot.org (dostęp: 15.05.2023 r.)

Spis tabel

Tabela 4.1 Parametry biochemiczne plazm pochodzących z białego i żółtego nasienia. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM 56
Tabela 4.2 Parametry biologiczne plemników pochodzących z nasienia białego i żółtego. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM 57
Tabela 4.3 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm białego nasienia 58
Tabela 4.4 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm żółtego nasienia 58
Tabela 4.5 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów 58
Tabela 4.6 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów 59
Tabela 4.7 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów 59
Tabela 4.8 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów 59
Tabela 4.9 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów 60
Tabela 4.10 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów 60
Tabela 4.11 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchu plemników białych ejakulatów 61
Tabela 4.12 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchu plemników żółtych ejakulatów 61
Tabela 4.13 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów 62
Tabela 4.14 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów 62
Tabela 4.15 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów 63

Tabela 4.16 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów 63
Tabela 4.17 Parametry biochemiczne plazm nasienia w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM 64
Tabela 4.18 Parametry biologiczne plemników w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM 65
Tabela 4.19 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia w sezonie wiosenno-letnim 66
Tabela 4.20 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia w sezonie jesienno-zimowym 66
Tabela 4.21 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchu plemników w sezonie wiosenno-letnim 67
Tabela 4.22 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchu plemników w sezonie jesienno-zimowym 67
Tabela 4.23 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim 68
Tabela 4.24 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym 68
Tabela 4.25 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim 68
Tabela 4.26 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym 69
Tabela 4.27 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników w sezonie wiosenno-letnim 69
Tabela 4.28 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchu plemników w sezonie jesienno-zimowym 69
Tabela 4.29 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim 70
Tabela 4.30 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym 70

Tabela 4.31 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników w sezonie wiosenno-letnim 71
Tabela 4.32 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników w sezonie jesienno-zimowym 71
Tabela 4.33 Parametry biochemiczne plazm z białego i żółtego nasienia w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM..... 72
Tabela 4.34 Parametry biologiczne plemników pochodzących z nasienia białego i żółtego w sezonie wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM. 74
Tabela 4.35 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim 75
Tabela 4.36 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia żółtego w sezonie wiosenno-letnim 75
Tabela 4.37 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia białego w sezonie jesienno-zimowym..... 75
Tabela 4.38 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia żółtego w sezonie jesienno-zimowym..... 76
Tabela 4.39 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników z białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim..... 76
Tabela 4.40 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 77
Tabela 4.41 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym..... 77
Tabela 4.42 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym..... 77
Tabela 4.43 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 78
Tabela 4.44 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 78
Tabela 4.45 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym..... 79
Tabela 4.46 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym..... 79
Tabela 4.47 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim..... 79

Tabela 4.48 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 80
Tabela 4.49 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 80
Tabela 4.50 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 80
Tabela 4.51 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 81
Tabela 4.52 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 81
Tabela 4.53 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 81
Tabela 4.54 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami ruchliwości plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 82
Tabela 4.55 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 82
Tabela 4.56 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 83
Tabela 4.57 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 83
Tabela 4.58 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biologicznymi plemników żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 83
Tabela 4.59 Wartości współczynników korelacji pomiędzy wybranymi parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 84
Tabela 4.60 Wartości współczynników korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 84

Tabela 4.61 Wartości współczynników korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 85
Tabela 4.62 Wartości współczynników korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi plazm nasienia a parametrami biochemicznymi plemników z żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 85
Tabela 4.63 Porównanie profili białkowych wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE..... 88
Tabela 4.64 Porównanie profili białkowych wybranych plazm żółtego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE..... 88
Tabela 4.65 Porównanie profili białkowych Tricine-PAGE wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym..... 91
Tabela 4.66 Porównanie profili białkowych Tricine-PAGE wybranych żółtych plazm nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym..... 91
Tabela 4.67 Porównanie profili białkowych Urea-PAGE wybranych plazm nasienia białego indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym 94
Tabela 4.68 Porównanie profili białkowych Urea-PAGE wybranych żółtych plazm nasienia żółtego indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym..... 94
Tabela 4.69 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonie wiosenno-letnim. 97
Tabela 4.70 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych plazm białego nasienia indorów w sezonie jesienno-zimowym..... 97
Tabela 4.71 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych plazm żółtego nasienia indorów w sezonie wiosenno-letnim 99
Tabela 4.72 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych żółtych plazm nasienia indorów w sezonie jesienno-zimowym..... 99
Tabela 4.73 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów 100
Tabela 4.74 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm nasienia pobranych w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia..... 100
Tabela 4.75 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z plazm nasienia uzyskanych metodami SDS-PAGE oraz Nano LC-MS/MS 101
Tabela 4.76 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów 117

Tabela 4.77 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych plazm nasienia pobranych w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia 117
Tabela 4.78 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z plazm nasienia uzyskanych metodami 2D-PAGE oraz MALDI-TOF/TOF 118
Tabela 4.79 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE 121
Tabela 4.80 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE 121
Tabela 4.81 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE 124
Tabela 4.82 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE 124
Tabela 4.83 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE 127
Tabela 4.84 Porównanie profili białkowych wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE 127
Tabela 4.85 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonie wiosenno-letnim 131
Tabela 4.86 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym 131
Tabela 4.87 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie wiosenno-letnim 133
Tabela 4.88 Porównanie profili białkowych SDS-PAGE wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym 133
Tabela 4.89 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów 134
Tabela 4.90 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia pobranego w sezonach

wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia 134
Tabela 4.91 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z ekstraktów plemnikowych uzyskanych metodami SDS-PAGE oraz Nano LC-MS/MS..... 135
Tabela 4.92 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego i żółtego nasienia niezależnie od wyznaczonych sezonów..... 150
Tabela 4.93 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) wybranych do identyfikacji frakcji białkowych ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia pobranego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym bez uwzględniania występowania syndromu żółtego nasienia 150
Tabela 4.94 Wyniki identyfikacji fosfoprotein pochodzących z ekstraktów plemnikowych uzyskanych metodami 2D-PAGE oraz MALDI-TOF/TOF 151
Tabela 4.95 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein plazm nasienia pochodzących z białego i żółtego nasienia bez względu na sezon. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM. 155
Tabela 4.96 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein plazm nasienia pochodzących z sezonu wiosenno-letniego i jesienno-zimowego bez względu na występowanie syndromu żółtego nasienia. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM..... 157
Tabela 4.97 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z białego i żółtego nasienia. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM. 162
Tabela 4.98 Średnie wartości gęstości optycznej (OD) zidentyfikowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia pobranego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym. Wyniki przedstawiono za pomocą średnich arytmetycznych ± SEM..... 163
Tabela 4.99 Miejsca fosforylacji zidentyfikowanych fosfoprotein..... 165
Tabela 4.100 Funkcje i lokalizacja komórkowa zidentyfikowanych fosfoprotein 176

Spis rycin

Rycina 4.1 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia białego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE 87
Rycina 4.2 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE 87
Rycina 4.3 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia białego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE..... 90
Rycina 4.4 Profil fosfoprotein wybranych plazm nasienia żółtego w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Tricine-PAGE..... 90
Rycina 4.5 Profil fosfoprotein wybranych plazm białego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE 93
Rycina 4.6 Profil fosfoprotein wybranych plazm żółtego nasienia w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Urea-PAGE 93
Rycina 4.7 Profil fosfoprotein wybranych plazm białego nasienia w sezonie wiosenno-letnim uzyskanych metodą SDS-PAGE 96
Rycina 4.8 Profil fosfoprotein wybranych plazm białego nasienia w sezonie jesienno-zimowym uzyskanych metodą SDS-PAGE 96
Rycina 4.9 Profil fosfoprotein wybranych plazm żółtego nasienia w sezonie wiosenno-letnim uzyskanych metodą SDS-PAGE 98
Rycina 4.10 Profil fosfoprotein wybranych plazm żółtego nasienia w sezonie jesienno-zimowym uzyskanych metodą SDS-PAGE 98
Rycina 4.11 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia białego w sezonie wiosenno-letnim..... 113
Rycina 4.12 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia białego w sezonie jesienno-zimowym 113
Rycina 4.13 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia żółtego w sezonie wiosenno-letnim..... 114
Rycina 4.14 Elektroforeza 2D-PAGE plazmy nasienia żółtego w sezonie jesienno-zimowym 114
Rycina 4.15 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy białego nasienia w sezonie wiosenno-letnim..... 115
Rycina 4.16 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy białego nasienia w sezonie jesienno-zimowym..... 115
Rycina 4.17 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy żółtego nasienia w sezonie wiosenno-letnim..... 116
Rycina 4.18 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein plazmy żółtego nasienia w sezonie jesienno-zimowym..... 116
Rycina 4.19 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych z białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE 120

Rycina 4.20 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych z białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE 120
Rycina 4.21 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Tricine-PAGE 123
Rycina 4.22 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Tricine-PAGE 123
Rycina 4.23 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Urea-PAGE.. 126
Rycina 4.24 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskany metodą Urea-PAGE.. 126
Rycina 4.25 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białego nasienia indorów w sezonie wiosenno-letnim uzyskany metodą SDS-PAGE..... 130
Rycina 4.26 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym uzyskany metodą SDS-PAGE..... 130
Rycina 4.27 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie wiosenno-letnim uzyskany metodą SDS-PAGE..... 132
Rycina 4.28 Profil fosfoprotein wybranych ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów indorów w sezonie jesienno-zimowym uzyskany metodą SDS-PAGE..... 132
Rycina 4.29 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 146
Rycina 4.30 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 146
Rycina 4.31 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 147
Rycina 4.32 Elektroforeza 2D-PAGE ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym 147
Rycina 4.33 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 148
Rycina 4.34 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych białych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym..... 148
Rycina 4.35 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie wiosenno-letnim 149
Rycina 4.36 Elektroforeza 2D-PAGE fosfoprotein ekstraktów plemnikowych żółtych ejakulatów w sezonie jesienno-zimowym..... 149

Rycina 4.37 Analiza fosfoproteomów plazm białego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych 153
Rycina 4.38 Analiza fosfoproteomów plazm białego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych..... 153
Rycina 4.39 Analiza fosfoproteomów plazm białego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych..... 153
Rycina 4.40 Analiza fosfoproteomów plazm żółtego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych 154
Rycina 4.41 Analiza fosfoproteomów plazm żółtego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych..... 154
Rycina 4.42 Analiza fosfoproteomów plazm żółtego nasienia indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych..... 154
Rycina 4.43 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych..... 160
Rycina 4.44 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych 160
Rycina 4.45 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z białych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych 160
Rycina 4.46 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z żółtych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfoserynowych..... 161
Rycina 4.47 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z żółtych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotreoninowych 161
Rycina 4.48 Analiza fosfoproteomów ekstraktów plemnikowych pochodzących z żółtych ejakulatów indorów z wykorzystaniem przeciwciał anty-fosfotyrozynowych..... 161
Rycina 4.49 Dziesięć (Top Ten) najważniejszych funkcji zidentyfikowanych fosfoprotein plazm nasienia indorów. Sporządzony na podstawie bazy danych GO Biological Process w ShinyGO 0.77 191
Rycina 4.50 Dziesięć (Top Ten) najważniejszych funkcji zidentyfikowanych fosfoprotein ekstraktów plemnikowych indorów. Sporządzony na podstawie bazy danych GO Biological Process w ShinyGO 0.77 191
Rycina 4.51 Analiza sieci interakcji białko-białko pomiędzy zidentyfikowanymi fosfoproteinami plazm nasienia indorów przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. 192
Rycina 4.52 Grupa 1. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 1. (B) 193

Rycina 4.53 Grupa 2. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 2. (B) 194
Rycina 4.54 Grupa 3. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 3. (B) 195
Rycina 4.55 Grupa 4. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 4. (B) 195
Rycina 4.56 Grupa 5. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 5. (B) 196
Rycina 4.57 Grupa 6. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 6. (B) 196
Rycina 4.58 Grupa 7. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 7. (B) 197
Rycina 4.59 Grupa 8. sieci interakcji białko-białko plam nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 8. (B) 197
Rycina 4.60 Grupa 9. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 9. (B) 198
Rycina 4.61 Grupa 10. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 10. (B) 199
Rycina 4.62 Grupa 11. sieci interakcji białko-białko plazm nasienia przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 11. (B) 200
Rycina 4.63 Analiza sieci interakcji białko-białko pomiędzy zidentyfikowanymi fosfoproteinami ekstraktów plemnikowych pochodzących z nasienia indorów przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. 204
Rycina 4.64 Grupa 1. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 1. (B) 205

Rycina 4.65 Grupa 2. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 2. (B) 206
Rycina 4.66 Grupa 3. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 3. (B) 207
Rycina 4.67 Grupa 4. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 4. (B) 208
Rycina 4.68 Grupa 5. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 5. (B) 208
Rycina 4.69 Grupa 6. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. 209
Rycina 4.70 Grupa 7. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. 209
Rycina 4.71 Grupa 8. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 8. (B) 209
Rycina 4.72 Grupa 9. sieci interakcji białko-białko ekstraktów plemnikowych przeprowadzona przez internetową bazę danych STRING 11.5. (A) oraz wybrane funkcje białek grupy 9. (B) 210
Rycina 4.73 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plamie nasieniu białego (kolor biały) i żółtego (kolor żółty) 211
Rycina 4.74 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plemnikach nasienia białego (kolor biały) i żółtego (kolor żółty) 212
Rycina 4.75 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plazmie nasienia pochodzącego z sezonu wiosenno-letniego (kolor zielony) i jesienno-zimowego (kolor niebieski) 213
Rycina 4.76 Schemat przedstawiający geny, których produkty podlegają zróżnicowanej fosforylacji w plemnikach nasienia pochodzącego z sezonu wiosenno-letniego (kolor zielony) i jesienno-zimowego (kolor niebieski) 214

Analiza fosfoproteomów ejakulatów indorów (*Meleagris gallopavo*) o zróżnicowanej jakości biologicznej

mgr inż. Katarzyna Teresa Rafalska

Streszczenie

W przemysłowej hodowli indyków (*Meleagris gallopavo*) rozród odbywa się wyłącznie poprzez sztuczną inseminację w związku ze zbyt dużym dymorfizmem płciowym samców i samic tego gatunku. Dodatkowym utrudnieniem jest wykorzystanie do inseminacji jedynie nasienia świeżego, ponieważ wciąż nie ustalono optymalnego składu buforu pozwalającego na kriokonserwację nasienia indorów. Przy zbyt długiej ekspozycji na wysoką temperaturę mechanizmy termoregulacyjne ptaków mogą zostać przeciążone. W rezultacie może dojść do wystąpienia stresu cieplnego i zachwiania homeostazy organizmu. W populacji indorów około 10-16% osobników dotkniętych jest syndromem żółtego nasienia (YSS). Występowanie omawianego syndromu charakteryzuje się niższymi i/lub podwyższonymi wartościami wybranych parametrów ilościowych i jakościowych ejakulatów a także obecnością i/lub brakiem wybranych białek w nasieniu indorów. Użycie ejakulatów YSS podczas zabiegu sztucznego unasieniania prowadzi do obniżenia skuteczności zapładniania samic. Przyczyny występowania YSS nadal pozostają nieznane.

Celem niniejszej pracy była analiza fosfoproteomów plazm nasienia i plemników pochodzących z ejakulatów prawidłowych i z YSS podczas dwóch wyodrębnionych sezonów tj. wiosenno-letniego i jesienno-zimowego, którą poprzedzono dokładną analizą ilościową i jakościową ejakulatów.

W nasieniu świeżym dokonano pomiaru koncentracji i ruchliwości plemników oraz oceny ich żywotności, w tym integralności błon komórkowych w regionie akrosomowym, funkcjonalności mitochondriów, występowania zmian apoptotycznych oraz detekcji tlenku azotu w plemnikach. W plazmach nasienia oraz plemnikach przeprowadzono oznaczenia aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych – SOD, GPx, CAT oraz pomiar zawartości GSH i MDA. Dodatkowo w plazmach nasienia oznaczono zawartość białka całkowitego oraz zmierzono aktywność fosfatazy kwaśnej i alkalicznej. Ponadto z obu składowych nasienia wyizolowano białka ufosforylowane i rozdzielono je przy pomocy metod Native-PAGE, Tricine-PAGE, Urea-PAGE, SDS-PAGE oraz 2D-PAGE. Wybrane

fosfoproteiny, rozdzielone przy użyciu dwóch ostatnich technik, zidentyfikowano metodą Nano LC-MS/MS i/lub MALDI-TOF/TOF.

W ramach niniejszej pracy potwierdzono, że nasienie żółte indorów cechuje się obniżonymi parametrami jakościowymi w stosunku do nasienia białego. Po raz pierwszy wykazano, że sezon wpływa na wybrane parametry biologiczne i biochemiczne nasienia indorów. Statystycznie istotnie wyższe poziomy aktywności fosfataz kwaśnej i alkalicznej obserwowano w plazmach nasienia YSS oraz podczas sezonu jesienno-zimowego. Dowiedziono, że na profile ufosforylowania reszt serynowych i tyrozynowych białek wpływ mają zarówno występowanie syndromu żółtego nasienia jak i sezon. W nasieniu indorów zidentyfikowano łącznie 142 fosfoproteiny. Wśród nich występowały m.in. białka kodowane przez geny: UBB, RPS27A, SPATA18, CDC42, ACTN, TBB, ACTA, ODF2, GAPDH, PGAM, PGK, TPI, ALDOC, LDH, SDHA, FASN, APOA, CKM, GOT, CA, CALM, TRFC, FTH, HSPA, HSP, GST, PRDX, QSOX, ASTL, ANXA, ACR, GSN, VDAC oraz PLCZ1. Zidentyfikowane fosfoproteiny biorą m.in. udział w interakcji i wiązaniu się z plemnika z komórką jajową, procesie zapłodnienia, organizacji cytoszkieletu, metabolizmie plemników, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz ustalaniu składów proteomów poszczególnych przedziałów komórkowych. Wykazano, że na stopień ufosforylowania omawianych białek wpływa rodzaj nasienia jak również trwający sezon.

Słowa kluczowe: indor, plazma nasienia, plemniki, nasienie białe, YSS, sezon, parametry biologiczne i biochemiczne ejakulatu, fosfoproteom nasienia

Analysis of phosphoproteomes of turkey (*Meleagris gallopavo*) ejaculates with different biological quality

mgr inż. Katarzyna Teresa Rafalska

Summary

The professional turkey (*Meleagris gallopavo*) breeding relies entirely on artificial insemination due to the excessive sexual dimorphism between males and females of this species. Another problem is inability to use any kind of preserved semen, apart from fresh one, during mating. The optimal buffer composition which would allow for cryopreservation of turkey semen has still not been established. When birds are exposed to higher temperatures for too long, theirs thermoregulatory mechanisms can become overloaded. As a result, heat stress can occur, and the body's homeostasis can be disturbed. In the turkey population, approximately 10-16% of individuals are affected by yellow semen syndrome (YSS). It is mainly characterized by lower values of selected quantitative and qualitative parameters of the ejaculates as well as presence and/or absence of chosen proteins in semen. The usage of ejaculate affected by YSS in AI leads to reduced fertilization efficiency. The causes of yellow semen syndrome occurrence are still unknown.

The aim of the present study was to analyse the phosphoproteomes of seminal plasma and spermatozoa derived from normal and YSS ejaculates during the two distinguished periods i.e., spring-summer and autumn-winter season, which was preceded by in-depth analysis of chosen biological and biochemical parameters of semen.

In fresh semen, sperm concentration and motility were measured, and sperm viability was assessed, including cell membrane integrity in the acrosome region, mitochondrial functionality, occurrence of apoptotic changes and nitric oxide detection in sperm. The activity of selected antioxidant enzymes - SOD, GPx, CAT - and measurement of GSH and MDA content were determined both in seminal plasmas and spermatozoa. In addition, total protein content was determined in the plasmas and the activity of acid and alkaline phosphatase was measured. Furthermore, phosphorylated proteins were isolated from both semen components and separated by means of Native-PAGE, Tricine-PAGE, Urea-PAGE, SDS-PAGE and 2D-PAGE. Selected phosphoproteins, separated by the latter two techniques, were identified by Nano LC-MS/MS and/or MALDI-TOF/TOF.

The present study confirmed that turkey semen with YSS is characterized by reduced quality parameters as compared to white semen. For the first time, it was shown that the season affects selected biological and biochemical parameters of turkey semen. Statistically significantly higher levels of acid and alkaline phosphatase activities were observed in the plasmas of YSS semen and during the autumn-winter season. It was proven that the phosphorylation profiles of serine and tyrosine residues of proteins are affected by both the occurrence of yellow semen syndrome and the season. A total of 142 phosphoproteins were identified in turkey semen. Among them were the proteins encoded by the following genes: UBB, RPS27A, SPATA18, CDC42, ACTN, TBB, ACTA, ODF2, GAPDH, PGAM, PGK, TPI, ALDOC, LDH, SDHA, FASN, APOA, CKM, GOT, CA, CALM, TRFC, FTH, HSPA, HSP, GST, PRDX, QSOX, ASTL, ANXA, ACR, GSN, VDAC and PLCZ1. The identified phosphoproteins are involved in, among other things, interaction and binding with an oocyte, the fertilization process, cytoskeletal organization, sperm metabolism, intracellular transport, and determination of the proteome composition of individual cellular compartments. It has been shown that the degree of phosphorylation of mentioned proteins is affected by the type of semen as well as the ongoing season.

Keywords: turkey, seminal plasma, spermatozoa, white semen, YSS, season, biological and biochemical parameters of an ejaculate, semen phosphoproteome