UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ: Bioinżynierii Zwierząt
Dziedzina: Nauki Rolnicze
Dyscyplina: Zootechnika i Rybactwo

mgr inż. Nicoletta Magdalena Neuman

Rozprawa doktorska

Właściwości biologiczne najądrzowych plemników poddanych różnym procedurom technologicznym oraz status antyoksydacyjny jąder i najądrzy jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*)

Biological properties of epididymal spermatozoa subjected to different technological procedures and the antioxidant status of testes and epididymis of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*)

Praca wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt

Promotor: dr hab. Anna Dziekońska, prof. UWM
Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Promotor pomocniczy: dr Przemysław Gilun
Zespół Fizjologii i Toksykologii, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, 2026

Informacja o finansowaniu badań

Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane ze środków przeznaczonych na działalność naukową i prace rozwojowe (dotacja MNiSW na badania statutowe, nr tematu: 11.610.003-110) oraz dofinansowane w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki „Regionalna Inicjatywa Doskonałości", realizowanego w latach 2019–2023 i 2024–2027.





Informacja o pozyskaniu materiału do badań

Materiał do badań pozyskano w ramach porozumienia o współpracy pomiędzy Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie a Nadleśnictwem Nowe Ramuki zawartym w dniu 01.04.2021 r.

Spis publikacji naukowych

Podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji naukowych dotyczących badań nad właściwościami biologicznymi plemników najądrzowych jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*) poddanych różnym procedurom technologicznym oraz statusem antyoksydacyjnym wybranych tkanek układu rozrodczego:

P1: Neuman, N.M., Dziekońska, A., Orzołek, A., Gilun, P. (2024). A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5°C. *Animal Reproduction Science*, *260*, 107387. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387

IF = 3,3; **IF$_{5\text{-year}}$** = 2,6; **MEiN**[1] = 140 pkt.

P2: Neuman, N.M., Orzołek, A., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Dziekońska, A. (2024). Changes in the morphology and antioxidant status of European red deer sperm stored in the epididymides and in a liquid state. *Animals*, *14*, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653

IF = 2,7; **IF$_{5\text{-year}}$** = 3,2; **MEiN**[1] = 100 pkt.

P3: Neuman, N.M., Gilun, P., Koziorowska-Gilun, M., Janiszewski, P., Dziekońska, A. (2025). Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the reproductive tissues of male European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). *International Journal of Molecular Sciences*, *26*, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221

IF = 4,9; **IF$_{5\text{-year}}$** = 5,7; **MEiN**[1] = 140 pkt.

Razem:

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 380 pkt.

Sumaryczny szacunkowy IF: 10,9

Sumaryczny szacunkowy IF$_{5\text{-year}}$: 11,5

[1] Liczba punktów wg Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 5 stycznia 2024 roku.

Spis treści

Informacja o finansowaniu badań 2

Informacja o pozyskaniu materiału do badań 2

Spis publikacji naukowych 3

Spis treści 4

Streszczenie 6

Abstract 7

1. Wstęp 8

1.1. Jeleń szlachetny 9

1.1.1. Charakterystyka gatunku – jeleń szlachetny 9

1.1.2. Sezon rozrodczy 10

1.2. Układ rozrodczy jelenia szlachetnego 11

1.3. Charakterystyka ejakulatu jelenia szlachetnego 12

1.3.1. Wpływ sezonu na frakcje ejakulatu 12

1.4. Metody pozyskiwania nasienia 13

1.4.1. Metoda sztucznej pochwy 13

1.4.2. Metoda elektroejakulacji 13

1.4.3. Metoda *post mortem* 14

1.5. Konserwacja nasienia 14

1.6. System antyoksydacyjny 16

2. Hipotezy badawcze 18

3. Cele badawcze 19

4. Zakres badań 20

5. Materiał i metody 21

5.1. Materiał badawczy i przygotowanie prób do badań 21

5.2. Metody badawcze 23

5.2.1. Analiza parametrów ruchu plemników najądrzowych 23

5.2.2. Ocena żywotności plemników 23
5.2.3. Ocena aktywności mitochondriów 24
5.2.4. Ocena integralności błony akrosomalnej 25
5.2.5. Ocena zmian apoptotycznych i żywotności plemników 25
5.2.6. Ocena integralności DNA 26
5.2.7. Ocena morfologiczna plemników 26
5.2.8. Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych 26
5.2.8.1. Dysmutaza ponadtlenkowa 27
5.2.8.2. Peroksydaza glutationowa 27
5.2.8.3. Katalaza 28
5.2.9. Poziom dialdehydu malonowego 28
5.2.10. Ekspresja genów 28
5.2.10.1. Odwrotna transkrypcja 28
5.2.10.2. Real-Time PCR 28
5.2.10.3. Western blot 29
5.2.10.3.1. SDS PAGE 29
5.2.10.3.2. Półsuchy transfer białek 30
5.2.10.3.3. Inkubacja przeciwciał 30
5.3. Analiza statystyczna 31
6. Wyniki 32
7. Dyskusja 50
8. Podsumowanie i wnioski 60
Spis literatury 62
Spis tabel i figur 77
Oświadczenia 79
Załączniki 82

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań była ocena właściwości biologicznych plemników najądrzowych jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*) przechowywanych w stanie płynnym oraz w najądrzach w temperaturze 5°C do 6 dni. Ponadto oceniono status antyoksydacyjny tkanek jąder i najądrzy pozyskanych w sezonie rozrodczym (wrzesień–październik) oraz poza sezonem rozrodczym (grudzień–luty).

Materiał do badań stanowiły jądra wraz z najądrzami pobrane *post mortem* od byków odstrzelonych podczas polowań. Plemniki do badań zostały pozyskane z ogona najądrzy. Analiza właściwości biologicznych plemników uwzględniała ocenę ruchliwości i parametrów ruchu, integralności błon plazmatycznych i akrosomalnych, aktywności mitochondriów, integralności DNA oraz zmian apoptotycznych. Dodatkowo oceniono morfologię plemników, aktywność enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej – SOD, peroksydazy glutationowej – GPx, katalazy – CAT oraz intensywność peroksydacji lipidów (poziom dialdehydu malonowego – MDA). Ocena statusu antyoksydacyjnego tkanek jąder oraz najądrzy dotyczyła m.in. analizy aktywności SOD, GPx i CAT oraz ekspresji ich genów.

Analiza wyników wykazała, że czas i metoda przechowywania miały istotny wpływ na właściwości biologiczne najądrzowych plemników. Przechowywanie w najądrzach skutkowało wcześniejszym obniżeniem wartości większości badanych zmiennych w porównaniu do przechowywania w stanie płynnym. Istotne różnice ($p \leq 0{,}05$) pomiędzy wariantami przechowywania obserwowano od 48 h przechowywania w charakterystyce ruchu plemników, a po 144 h przechowywania stwierdzono je także dla innych badanych zmiennych oraz w statusie antyoksydacyjnym. W analizie statusu antyoksydacyjnego tkanek jąder i najądrzy wykazano istotne różnice w aktywności SOD, CAT i GPx oraz ekspresji ich genów, które zależne były od rodzaju tkanki i pory roku.

Przeprowadzone badania wskazują, że plemniki jelenia europejskiego można przechowywać w najądrzach w temperaturze 5°C do 96 h, jednak ich właściwości biologiczne są lepiej zachowywane podczas przechowywania w stanie płynnym. Status antyoksydacyjny jąder i najądrzy zmienia się w zależności od rodzaju tkanki i sezonu, zapewniając układowi rozrodczemu optymalną ochronę przed stresem oksydacyjnym.

Słowa kluczowe: jeleń europejski, plemniki najądrzowe, przechowywanie, status antyoksydacyjny, tkanki układu rozrodczego

Abstract

The aim of this study was to evaluate the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) epididymal spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymis at 5°C for up to 6 days. Furthermore, the antioxidant status of testicular and epididymal tissues collected during the rut season (September–October) and the non-rut season (December–February) was assessed.

The material for the study consisted of testicles and epididymis collected *post mortem* from stags shot during hunting. Spermatozoa were obtained from the cauda epididymis. The analysis of the biological properties of spermatozoa included the assessment of motility and movement parameters, the integrity of plasma and acrosomal membranes, mitochondrial activity, DNA integrity, and apoptotic changes. In addition, spermatozoa morphology, the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase – SOD, glutathione peroxidase – GPx, and catalase – CAT, and lipid peroxidation intensity (malondialdehyde – MDA) were evaluated. The assessment of the antioxidant status of testicular and epididymal tissues included analysis of SOD, GPx, and CAT activity and their gene expression.

The analysis of results showed that storage time and method had a significant impact on the biological properties of epididymal spermatozoa. Storage in the epididymis resulted in an earlier lowered in most of the studied variables compared to storage in the liquid state. Significant differences ($p \leq 0.05$) between storage variants were observed from 48 h of storage in the characteristics of spermatozoa motility, and after 144 h of storage, they were also found for other tested variables and in the antioxidant status. Analysis of the antioxidant status of testicular and epididymal tissues showed significant differences in SOD, CAT, and GPx activity and their gene expression, which depended on the tissue type and season.

The study indicates that European red deer spermatozoa can be stored in the epididymis at 5°C for up to 96 hours, but their biological properties are better preserved during storage in the liquid state. The antioxidant status of the testicles and epididymis varies depending on tissue type and season, providing the reproductive system with optimal protection against oxidative stress.

Key words: European red deer, epididymal spermatozoa, conservation, antioxidant status, reproductive tissues

1. Wstęp

Chów fermowy jeleniowatych najbardziej rozwinięty na świecie jest w Nowej Zelandii (Mackintosh i in., 2014). Na naszym kontynencie największe hodowle jeleniowatych znajdziemy w Norwegii, Holandii, Litwie, Wielkiej Brytanii oraz Niemczech. W Polsce hodowla jeleniowatych jest w regresie ze względu na niskie zainteresowanie konsumentów dziczyzną (Cilulko, 2011; Kwiecińska i in., 2018). Hodowle jeleniowatych utrzymywane są głównie w celu pozyskania pantów do produkcji pantokryny, pozyskania komórek macierzystych z poroża oraz pozyskania mięsa o wysokich walorach dietetycznych. Ponadto hodowle tych zwierząt mogą prowadzić do ochrony zasobów genetycznych zwierząt (Dubiel i in., 2002; Garde i in., 2006).

Istniejące programy hodowlane umożliwiają poprawę oraz optymalizację zysków z wykorzystaniem różnych technik reprodukcyjnych. Najczęstszymi metodami wspomaganego rozrodu wykorzystywanymi u jeleniowatych są przechowywanie gamet oraz sztuczna inseminacja (Prieto i in., 2014). Techniki wykorzystywane w rozrodzie jeleniowatych najczęściej są modyfikacjami procedur wykorzystywanych, np. u bydła, kóz, czy owiec (Demianowicz i in., 2008). Wraz z rozwojem hodowli fermowej jeleniowatych istnieje ciągła potrzeba rozwoju i poznawania nowych metod dotyczących rozrodu tych zwierząt, mając na uwadze postęp genetyczny (Dubiel i in., 2002).

Prowadzenie technik wspomaganego rozrodu u zwierząt wolno żyjących jest trudne, w związku z ich behawiorem, a także fizjologią układu rozrodczego (Asher i in., 2000). Jedną z najbezpieczniejszych oraz najczęściej wykorzystywanych metod pozyskiwania plemników zwierząt wolno żyjących jest metoda *post mortem* (Martínez i in., 2008; Martinez-Pastor i in., 2006b). Tak pozyskane plemniki z ogona najądrzy można wykorzystać do sztucznej inseminacji (Garde i in., 2006; Saenz, 2007). Plemniki najądrzowe jeleniowatych mogą być z powodzeniem przechowywane w stanie płynnym w temperaturze 5°C (Dziekońska i in., 2020, 2022b; Soler i in., 2003), jak i zamrożonym (Fernández-Santos i in., 2006, 2009; Soler i in., 2003).

Zmiany zachodzące w różnych strukturach komórkowych można weryfikować z wykorzystaniem różnych barwników fluorescencyjnych. Przeprowadzenie szczegółowych analiz dotyczących m.in. błon plazmatycznych, mitochondriów, akrosomów, czy DNA może dostarczyć cennych informacji dotyczących jakości przechowywanych plemników, a także ich potencjalnej przydatności do inseminacji, czy procesu zapłodnienia *in vitro*. Dodatkowo badania dotyczące możliwości przechowywania plemników mogą dostarczać informacji na temat wpływu różnych czynników konserwacji (tj. rozcieńczalnika, czasu, czy temperatury) na

jakość plemników. Możliwość przechowywania plemników jest także uwarunkowana gatunkowo oraz osobniczo (Asher i in., 2000; Cheng i in., 2004; Fraser i in., 2007).

Przechowywanie nasienia w obniżonej temperaturze powoduje spowolnienie metabolizmu komórek (Paulenz i in., 2002; Rodríguez-Gil i Bonet, 2016). W przechowywaniu krótkoterminowym nasienia jeleniowatych wykorzystuje się rozcieńczalniki przeznaczone dla przeżuwaczy, które mogą mieć wpływ na jakość plemników oraz ich przydatność technologiczną (Fernández-Santos i in., 2006; Pintus i Ros-Santaella, 2014; Soler i in., 2005). Uzyskane do tej pory wyniki dotyczące przechowywania najądrzowych plemników jelenia szlachetnego w stanie płynnym, potwierdzają, że mogą one być także przechowywane przez znacznie dłuższy okres z zachowaniem swoich zdolności do zapłodnienia (Dziekońska i in., 2022a). Ponadto konkurencyjną metodą przechowywania plemników może być też przechowywanie ich w najądrzach (Soler i in., 2005). Ta metoda wydaje się najmniej czasochłonna oraz najbardziej ekonomiczna. Jakość przechowywanych plemników w najądrzach została wcześniej zbadana dla jeleniowatych tylko w odniesieniu do jelenia iberyjskiego (Fernández-Santos i in., 2009; Soler i in., 2005).

Podczas konserwacji plemników w obniżonej temperaturze są one narażone na występowanie szoku termicznego. Zjawisko to wpływa na wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) w plemnikach (Nair i in., 2006). W trakcie przechowywania plemników dochodzi także do wzrostu peroksydacji lipidów oraz zaburzeń w statusie antyoksydacyjnym, które mogą wpływać na żywotność, ruchliwość, a także morfologię plemników (Agarwal i in., 2014; Domínguez-Rebolledo i in., 2010). Głównymi enzymami antyoksydacyjnymi wchodzącymi w skład systemu antyoksydacyjnego są dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) oraz katalaza (CAT) (Aitken i Roman, 2008; Chabory i in., 2010).

1.1. Jeleń szlachetny

1.1.1. Charakterystyka gatunku – jeleń szlachetny

Jeleń szlachetny należy do zwierząt przeżuwających, rząd: parzystokopytne (*Artiodactyla*), rodzina: jeleniowate (*Cervidae*), rodzaj: jeleń (*Cervus*) (Kiryjow i in., 2011). Masa ciała jeleni w populacji jest zróżnicowana pod względem płci, wieku oraz rejonu bytowania (Janiszewski i in., 2014). Masa ciała samic (łań) wynosi 80–120 kg, natomiast samca (byka) 150–220 kg. Jelenie mogą osiągać wysokość w kłębie do 1,40 m, a długość ich ciała może osiągać nawet do 2,50 m (Kiryjow i in., 2011).

Jelenie zmieniają okrywę włosową, którą w myślistwie nazywamy suknią, dwa razy w roku. Pierwsza zmiana występuje w kwietniu–maju, a druga we wrześniu–październiku. Zimowa sierść jest szaropłowa, a letnia okrywa włosowa ma kolor brunatnordzawy. Zimowy włos jest dłuższy, a okrywa włosowa gęstsza niż latem. Tył zadu tworzy u jeleni tzw. lustro. Jest ono koloru białego albo lekko kremowego, które jest otoczone ciemną obwódką (Janiszewski i in., 2014; Pasławski, 1987).

Żywienie jeleni w naturalnych warunkach zmienia się w zależności od pory roku. W trakcie letniego żeru jelenie zjadają zioła, krzewinki, pędy krzewów i drzew, a także trawy. Jesienią natomiast trawy, pędy krzewów i drzew oraz krzewinki (głównie wrzosy). Zimą zjadają głównie drzewa i krzewy oraz krzewinki (Janiszewski i in., 2014).

Jelenie tworzą tzw. chmary, ponieważ są zwierzętami stadnymi. Chmary liczą od kilku do kilkunastu osobników i są jednopłciowe z wyjątkiem okresu rozrodczego (Janiszewski i in., 2014). Stado żeńskie złożone jest z kilku łań i ich potomstwa (młode łanie i młode byczki do 3 roku ich życia). Takiemu stadu przewodzi starsza łania mająca cielaka, którą nazywamy licówką. Przed zbliżającym się okresem rozrodczym chmary byków zmniejszają swoją liczbę, aż do całkowitego rozpadu stada. W trakcie rykowiska do stada łań dołącza byk jelenia, tworząc harem (Godlewski, 1989; Janiszewski i in., 2014).

Jelenie osiągają dojrzałość płciową mając około 1,5 roku. Takie byki mogą produkować już dojrzałe plemniki. Jednak ze względu na uwarunkowania stadne, dopiero 3–4 letnie byki są w stanie wygrać walkę z młodszymi bykami od siebie i stworzyć harem (Bobek i in., 1992). Byki toczą walki między sobą o łanie, które dołączają do ich haremu. Im byk jest silniejszy, tym więcej łań ma w swojej chmarze (Pasławski, 1987). Podaje się, że byki walczą między sobą średnio raz na 5 dni w trakcie rykowiska (Bobek i in., 1992).

1.1.2. Sezon rozrodczy

Okres rozrodczy u jeleniowatych, zwany rykowiskiem, występuje jesienią, gdy skraca się dzień świetlny. Natomiast porody u jeleni odbywają się późną wiosną (maj–czerwiec) (Giżejewski, 2002; Janiszewski i in., 2014). W tym okresie panują najkorzystniejsze warunki dla prawidłowego wzrostu i rozwoju cieląt (Cilulko, 2011).

Według Giżejewskiego (2002) rykowisko można podzielić na następujące fazy:

- okres przedrykowiskowy (druga połowa lipca–pierwsza połowa sierpnia);
- okres rykowiska właściwego (druga połowa sierpnia–koniec listopada);
- okres porykowiskowy (początek grudnia–początek kwietnia).

W naszych warunkach klimatycznych okres rykowiska trwa od września do połowy października (Janiszewski i Daszkiewicz, 2008). Okres rykowiska jest dla byków jelenia szlachetnego szczególnym czasem (Giżejewski, 2002).

1.2. Układ rozrodczy jelenia szlachetnego

Męski układ rozrodczy ssaków zbudowany jest z narządów płciowych zewnętrznych i wewnętrznych (Krysiak i Świeżyński, 2009). Głównymi elementami są: gruczoły płciowe dodatkowe, prącie i para jąder. Jednak gruczoły dodatkowe płciowe nie występują u każdego gatunku zwierzęcia. Do tych gruczołów zalicza się gruczoły pęcherzykowe, prostatę, bańki nasieniowodów oraz gruczoły opuszkowo-cewkowe. Jądra produkują plemniki w procesie spermatogenezy. Następnie plemniki przedostają się do najądrzy, gdzie dojrzewają oraz są magazynowane. Podczas ejakulacji plemniki łączą się z wydzielinami dodatkowych gruczołów płciowych. Jądra wraz z najądrzami umieszczone są w mosznie, która zapewnia odpowiednie warunki dla ich prawidłowego funkcjonowania (Krysiak i Świeżyński, 2009).

Ogólna budowa układu rozrodczego u ssaków jest taka sama, jednak u każdego gatunku występują charakterystyczne cechy w budowie oraz różnice w funkcjonowaniu tego układu. Jedną z tych różnic u jelenia jest kształt jego prącia, które jest wygięte esowato. Prącie jelenia posiada parzyste mięśnie napletkowe. Natomiast cewka moczowa znajduje się po jego dogrzbietowej stronie. Takie umiejscowienie ujścia cewki moczowej jest uzasadnione, ponieważ w trakcie rykowiska byki wydzielają charakterystyczny zapach, który powstaje poprzez oddawanie moczu na podbrzusze oraz dolną część szyi. Charakterystyczną cechą prącia jeleni jest także możliwość zwiększenia jego długości nawet o około 40% w trakcie erekcji.

U jelenia dodatkowe gruczoły płciowe to prostata, parzyste bańki nasieniowodów, parzyste gruczoły opuszkowo-cewkowe oraz parzyste gruczoły pęcherzykowe. Bańki nasieniowodów pełnią funkcję magazynową dla wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych, a w okresie wiosennym mogą także gromadzić nieprawidłowe plemniki. Gruczoły pęcherzykowe mają budowę zrazikową, a ich funkcją jest produkcja frakcji żółtej w okresie rykowiska właściwego (Haigh, 2007).

1.3. Charakterystyka ejakulatu jelenia szlachetnego

1.3.1. Wpływ sezonu na frakcje ejakulatu

Nasienie składa się z plemników oraz plazmy nasienia. Plazma nasienia to mieszanina wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych (Strzeżek, 1998). Ejakulat byka jelenia szlachetnego można podzielić na trzy frakcje: szarą, białą i żółtą (Giżejewski, 2002). Nasienie pobrane w okresie rykowiska charakteryzuje się obecnością frakcji żółtej oraz białej. Natomiast w okresie przedrykowiskowym i porykowiskowym nasienie zawiera frakcję szarą. Frakcje nasienia wykazują zmienność sezonową, a ich cechy fizykochemiczne, takie jak barwa, lepkość, czy konsystencja nie są stabilne, w ciągu trwania rykowiska (Giżejewski, 2002).

Frakcja szara konsystencją przypomina mleko lub wodę. W jej skład wchodzą plemniki z ogona najądrzy oraz wydzieliny z dodatkowych gruczołów płciowych, głównie z gruczołów pęcherzykowych (Giżejewski, 2002).

Konsystencja frakcji białej przypomina mleko lub śmietanę. W tej frakcji znajdziemy głównie plemniki. Gęstość oraz intensywność barwy frakcji białej jest uzależniona od ilości plemników (Giżejewski, 2002).

Frakcja żółta nasienia wydzielana jest przez gruczoły pęcherzykowe (Dubiel i in., 2002). W okresie rykowiska właściwego barwa tej frakcji zmienia się od koloru bladożółtego do barwy intensywnie żółtej. Konsystencja tej frakcji także ulega zmianie rozpoczynając od postaci płynnej, gdzie w szczycie rykowiska osiąga konsystencję miodu. Frakcja ta nie zawiera plemników poza okresami przejściowymi. Zadaniem występowania frakcji żółtej jest prawdopodobnie uniemożliwienie cofania się plemników do ujścia pochwy (Dubiel i in., 2002; Giżejewski, 2002).

Skład biochemiczny ejakulatu jelenia szlachetnego do tej pory nie jest do końca poznany. Nieliczne badania dotyczą frakcji żółtej nasienia jelenia szlachetnego i skupiają się głównie na statusie antyoksydacyjnym (Koziorowska-Gilun i in., 2016). W tych badaniach wykazano istotny wpływ sezonu rozrodczego na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Najwyższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) odnotowano w szczycie rykowiska w porównaniu do okresu przedrykowiskowego i porykowiskowego. Enzymy antyoksydacyjne prawdopodobnie przyczyniły się do wytwarzania wysokiej jakości ejakulatów w okresie rykowiska.

1.4. Metody pozyskiwania nasienia

Behawior oraz fizjologia układu rozrodczego zwierząt wolno żyjących wprowadzają wiele ograniczeń w pozyskiwaniu nasienia (Asher i in., 2000). Dzikie zwierzęta w trakcie okresu rykowiska przejawiają cechy behawioralne, które są niebezpieczne dla ludzi, którzy pobierają od nich nasienie. Dodatkowo dużą trudnością jest brak odpowiedniej metody pobierania ejakulatów, tak żeby uniknąć zmian ilościowych oraz jakościowych nasienia (Giżejewski, 2002). Pozyskanie nasienia od jeleniowatych wykonuje się z wykorzystaniem sztucznej pochwy, poprzez elektroejakulację oraz *post mortem* (Giżejewski, 2002).

1.4.1. Metoda sztucznej pochwy

Pobieranie nasienia używając sztucznej pochwy jest metodą naturalną i najbardziej popularną metodą pobierania ejakulatów od zwierząt domowych, głównie bydła (Bhattacharyya i in., 2009). Metoda ta po raz pierwszy została zastosowana u jelenia szlachetnego przez Andrzeja Krzywińskiego w 1976 roku w Popielnie. Ze względu na inną budowę anatomiczną penisa u jelenia oraz specyfikę jego nasienia (podział na trzy frakcje) budowa sztucznej pochwy przeznaczonej dla buhajów została zmodyfikowana (Giżejewski, 2002). Ostateczna zmiana w jej budowie miała wspomóc dokładny rozdział ejakulatu na frakcje. Poprzez zastosowanie plastikowej bańki można obserwować dokładny przebieg ejakulacji u byków (Giżejewski, 2002).

Takie pozyskiwanie nasienia stosuje się głównie na fermach lub w ogrodach zoologicznych. Użycie sztucznej pochwy jest niebezpieczną procedurą ze względu na wielkość zwierząt oraz ich behawior. Zwierzęta wymagają odpowiedniego treningu, a personel musi być odpowiednio przeszkolony (Martínez i in., 2008).

1.4.2. Metoda elektroejakulacji

Metoda elektroejakulacji polega na pobieraniu ejakulatów od byków, które najpierw zostają uśpione z wykorzystaniem leków anestetycznych. Po uśpieniu zwierzęcia należy oczyścić z sierści okolice odbytu, ponieważ wprowadzana jest sonda doodbytnicza. Sonda działa przy stałym napięciu i natężeniu prądu (odpowiednio około 90 mA i 4,5 V), z ciągłą kontrolą parametrów. Nasienie pobierane jest do odpowiednio przygotowanych pojemników. Po wykonaniu procedury byki są wybudzane (Martínez i in., 2008; Martinez-Pastor i in., 2006b).

Elektroejakulacja znalazła szerokie zastosowanie w pobieraniu nasienia od jeleniowatych. Jednak nie pozwala ona na właściwą ocenę uzyskanego nasienia, ponieważ

pobudza dodatkowe gruczoły płciowe do zwiększenia ilości ich wydzielin. Jakość tak pobranego nasienia jest niższa niż jakość ejakulatów otrzymanych metodą sztucznej pochwy (Giżejewski, 2002). Dodatkowo ejakulat może zostać zanieczyszczony moczem. Dużym problemem jest także dobór odpowiedniej dawki anestetyku dla zwierzęcia w związku ze stresem w trakcie całej procedury oraz uwarunkowaniami osobniczymi. Natomiast zaletą elektroejakulacji jest możliwość rozdzielenia ejakulatu na frakcje (Martínez i in., 2008; Martínez-Pastor i in., 2009; Prieto i in., 2014).

1.4.3. Metoda *post mortem*

Plemniki można także pobrać od zwierząt upolowanych w czasie ich okresu rozrodczego. W metodzie *post mortem* pobierane są plemniki najądrzowe z ogona najądrzy, które pochodzą od odstrzelonych byków (Fernández-Santos i in., 2006). Po pobraniu jąder wraz z najądrzami skalpelem nacina się ogon najądrza w kilku miejscach, tak aby przeciąć kanaliki nasienne i pobrać plemniki poprzez aspirację lub wyciskanie (Dziekońska i in., 2020; Martínez-Pastor i in., 2005a). Takie plemniki mogą być łatwo dostępnym materiałem genetycznym w programach hodowlanych, w celu zapobiegania występowania chowu wsobnego (Hishinuma i in., 2003).

Istnieje wiele badań, które potwierdzają, że plemniki najądrzowe pozyskane w taki sposób są zdolne do zapłodnienia komórek jajowych (Comizzoli i in., 2001; Dziekońska i in., 2022a; Foote, 2000). Jednakże plemniki pozyskane *post mortem* mogą ulec szybkiej degeneracji (Wildt, 2000). Dlatego w celu przedłużenia ich żywotności zalecane jest przechowywanie w temperaturze 5°C i odpowiednich rozcieńczalnikach (Fernández-Santos i in., 2009; Soler i in., 2005).

1.5. Konserwacja nasienia

Konserwacja nasienia to proces, dzięki któremu można wykorzystać pobrane nasienie do celów reprodukcyjnych w innym miejscu i późniejszym czasie bez utraty jakości plemników (Jaroszewska, 2011). Przechowywanie nasienia (w stanie płynnym, a zwłaszcza zamrożonym) umożliwia jego transport na większe odległości, zwiększa też szansę przeżycia plemników przez dłuższy czas oraz ogranicza rozprzestrzenianie się chorób związanych z układem rozrodczym (Bielas, 2002; Jaroszewska, 2011). Przechowywanie nasienia może być krótkoterminowe (w stanie płynnym) lub długoterminowe (zamrażanie w temperaturze –196°C). Dodatkową mało poznaną metodą konserwacji może być przechowywanie plemników najądrzowych w najądrzach w warunkach chłodniczych. Obniżona temperatura przechowywania plemników powoduje spowolnienie ich metabolizmu, a tym samym przedłuża

ich żywotność oraz zdolności zapładniające (Johnson i in., 2000; Paulenz i in., 2002; Rodríguez-Gil i Bonet, 2016). Spowolnienie metabolizmu plemników powoduje także ograniczenie wykorzystania energii oraz gromadzenia się metabolitów, które uszkadzają plemniki (Gadea, 2003).

Temperatura przechowywania nasienia w stanie płynnym uzależniona jest od gatunku. Generalnie procedury konserwacji nasienia zwierząt wolno żyjących są modyfikacjami metod przechowywania plemników zwierząt hodowlanych, np. bydła, kóz, czy owiec (Asher i in., 2000; Garde i in., 2003; Zomborszky i in., 2005). Do konserwacji plemników knura zalecana temperatura to 15–20°C, natomiast dla plemników jelenia to 5°C (Dziekońska i in., 2020; Soler i in., 2005).

Konserwacja plemników w najądrzach jest najmniej poznaną metodą. W odniesieniu do jelenia szlachetnego badania zostały wcześniej przeprowadzone głównie dla jelenia iberyjskiego (Fernández-Santos i in., 2009; Soler i in., 2005).

W celu zwiększenia możliwości przechowywania plemników oraz zwiększenia ich żywotności wykorzystuje się odpowiednie rozcieńczalniki do przechowywania w stanie płynnym oraz zamrożonym. Rozcieńczalniki muszą spełniać określone właściwości, m.in. stanowić źródło potrzebnych składników odżywczych dla plemników, muszą opóźniać zachodzenie procesów starzenia się plemników oraz zabezpieczać funkcjonalność plemników na jak najwyższym poziomie (Gadea, 2003; Jaroszewska, 2011).

Prawidłowo dobrany rozcieńczalnik musi w swoim składzie mieć substancje, które zapewnią plemnikom:

- energię;
- ochronę przed udarem chłodowym;
- odpowiednie ciśnienie osmotyczne;
- odpowiednie pH;
- opóźnianie procesów starzenia plemników;
- hamowanie wzrostu bakterii (Estienne i in., 2007; Jaroszewska, 2011).

Dotychczas opracowano różne składy rozcieńczalników do przechowywania nasienia. W ich składzie uwzględniono metodę konserwacji nasienia oraz różnice występujące pomiędzy gatunkami, które dotyczą m.in. budowy błon plazmatycznych plemników, co wpływa na oporność plemników na udar chłodowy i osmotyczny oraz stres oksydacyjny (Dziekońska i in., 2017; Jaroszewska, 2011; Johnson i in., 2000; Salamon i Maxwell, 2000).

Głównym składnikiem rozcieńczalników jest glukoza, która zapewnia źródło energii dla plemników. Poza glukozą w rozcieńczalnikach wykorzystywane są też inne substraty zapewniające energię, m.in. fruktoza, galaktoza, ryboza, czy trehaloza (Gadea, 2003). Jednakże zbyt duża zawartość węglowodanów w rozcieńczalnikach może wpłynąć negatywnie na plemniki, ponieważ dochodzi wtedy do obniżenia wewnątrzkomórkowego pH. W celu zapobiegania takiej sytuacji do rozcieńczalników dodawane są substancje buforujące, np. cytrynian sodu, wodorowęglan sodu, czy związki kompleksowe takie jak kwas 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-etanosulfonowy (HEPES), tris(hydroksymetylo)aminometan (Tris), czy kwas 3-(N-morfolino)propanosulfonowy (MOPS) (Gadea, 2003; Ambrogi i in., 2006). Dzięki tym substancjom pH utrzymuje się na poziomie około 7,0. W celu zapobiegania występowania udaru chłodowego plemników stosowane są różne dodatki, m.in. albumina bydlęca (BSA), żółtko jaja kurzego, białko mleka (Manjunath i in., 2002; Plante i in., 2016; Tsutsui i in., 2003). Alternatywnym składnikiem dla żółtka jaja kurzego jest lecytyna sojowa (Nguyen i in., 2019).

Do rozcieńczalników mogą być także dodawane antybiotyki, m.in. penicylina z streptomycyną, neomycyna, kanamycyna, czy gentamycyna. Stosuje się je w celu ograniczenia rozwoju i namnażania się drobnoustrojów (bakterii i grzybów) w trakcie procesu konserwacji nasienia (Gadea, 2003).

Do przechowywania nasienia jelenia szlachetnego w stanie płynnym używa się m.in. rozcieńczalnika Salomon (Dziekońska i in., 2020; Fernández-Santos i in., 2006, 2009; Soler i in., 2005). Rozcieńczalnik Salomon zawiera m.in. 0,22 M Tris, 0,07 M kwas cytrynowy, 0,05 M fruktozy oraz 20% żółtko jaja kurzego (v/v). W wielu badaniach stwierdzono, że ten rozcieńczalnik wspomaga utrzymanie żywotności plemników jelenia przechowywanych w 5°C przez wiele dni (Dziekońska i in., 2020; Fernández-Santos i in., 2006; Soler i in., 2003, 2005). Prowadzono także badania dotyczące wykorzystywania rozcieńczalników komercyjnych do przechowywania plemników jelenia szlachetnego w stanie płynnym (Dziekońska i in., 2022a, 2022b; Soler i in., 2003). Jednak to prawidłowy dobór rozcieńczalnika determinuje zachowanie właściwości biologicznych plemników na wysokim poziomie przez wiele dni. Składy rozcieńczalników są cały czas aktualizowane, jednak podstawowe składniki nie ulegają zmianie (Bergeron i Manjunath, 2006).

1.6. System antyoksydacyjny

Jakość przechowywanych plemników może być osłabiona przez różne czynniki, w tym stres oksydacyjny. Stres oksydacyjny zwiększa peroksydację lipidów i zaburza aktywność

enzymów antyoksydacyjnych (Cassani i in., 2005; Partyka i in., 2012). Stres oksydacyjny powoduje również uszkodzenia organelli komórkowych i zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu (RFT) (Aitken i Roman, 2008; Barik i in., 2019; Chabory i in., 2010; Partyka i in., 2012). RFT są wytwarzane we wszystkich organizmach żywych i odgrywają ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych (Agarwal i in., 2005; Chabory i in., 2010). Jednak nadmierna produkcja RFT negatywnie wpływa na produkcję i dojrzewanie gamet oraz wszystkich tkanek organizmu (Agarwal i in., 2005; Łuszczewski i in., 2007). Nadmierna produkcja RFT może doprowadzić także do fragmentacji DNA w komórkach (Lopes i in., 1998). Przechowywanie plemników w obniżonych temperaturach także nasila wytwarzanie RFT i zwiększa ich podatność na peroksydację lipidów (Nair i in., 2006). W zdrowych organizmach systemy obrony antyoksydacyjnej zapewniają ochronę przed szkodliwym działaniem RFT (Drevet, 2006; Koziorowska-Gilun i in., 2015). Do kluczowych enzymów antyoksydacyjnych należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza (CAT), znanych jako triada enzymatyczna (Aitken i Roman, 2008; Bartosz, 2013; Chabory i in., 2010; Frączek i Kurpisz, 2005; Koziorowska-Gilun i in., 2013, 2015). System antyoksydacyjny wspierany jest także przez przeciwutleniacze o niskiej masie cząsteczkowej, takie jak witamina C, L-glutation, witamina E oraz D, a także tauryna, karotenoidy, czy ubichinony (Chabory i in., 2010; Gadea i in., 2004; Perumal, 2014). Komórki plemnikowe wykorzystują enzymy antyoksydacyjne w najądrzach oraz własną zdolność antyoksydacyjną, aby łagodzić szkodliwe skutki działania RFT podczas transportu przez najądrza, przechowywania plemników i procesu zapłodnienia (Koziorowska-Gilun i in., 2011).

2. Hipotezy badawcze

Hipoteza badawcza badań zakładała, że najądrzowe plemniki jelenia europejskiego mogą być przechowywane do kilku dni w najądrzach i w stanie płynnym.

Przyjęto, że rodzaj konserwacji – przechowywanie w stanie płynnym oraz przechowywanie w najądrzach, mogą wpływać na przeżywalność plemników, na ich ruchliwość, integralność błon plazmatycznych, integralność DNA oraz utrzymanie stabilnego statusu antyoksydacyjnego. Dodatkowym aspektem wpływu na zachowanie właściwości biologicznych plemników może być rodzaj rozcieńczalnika, który zostanie wykorzystany do przechowywania.

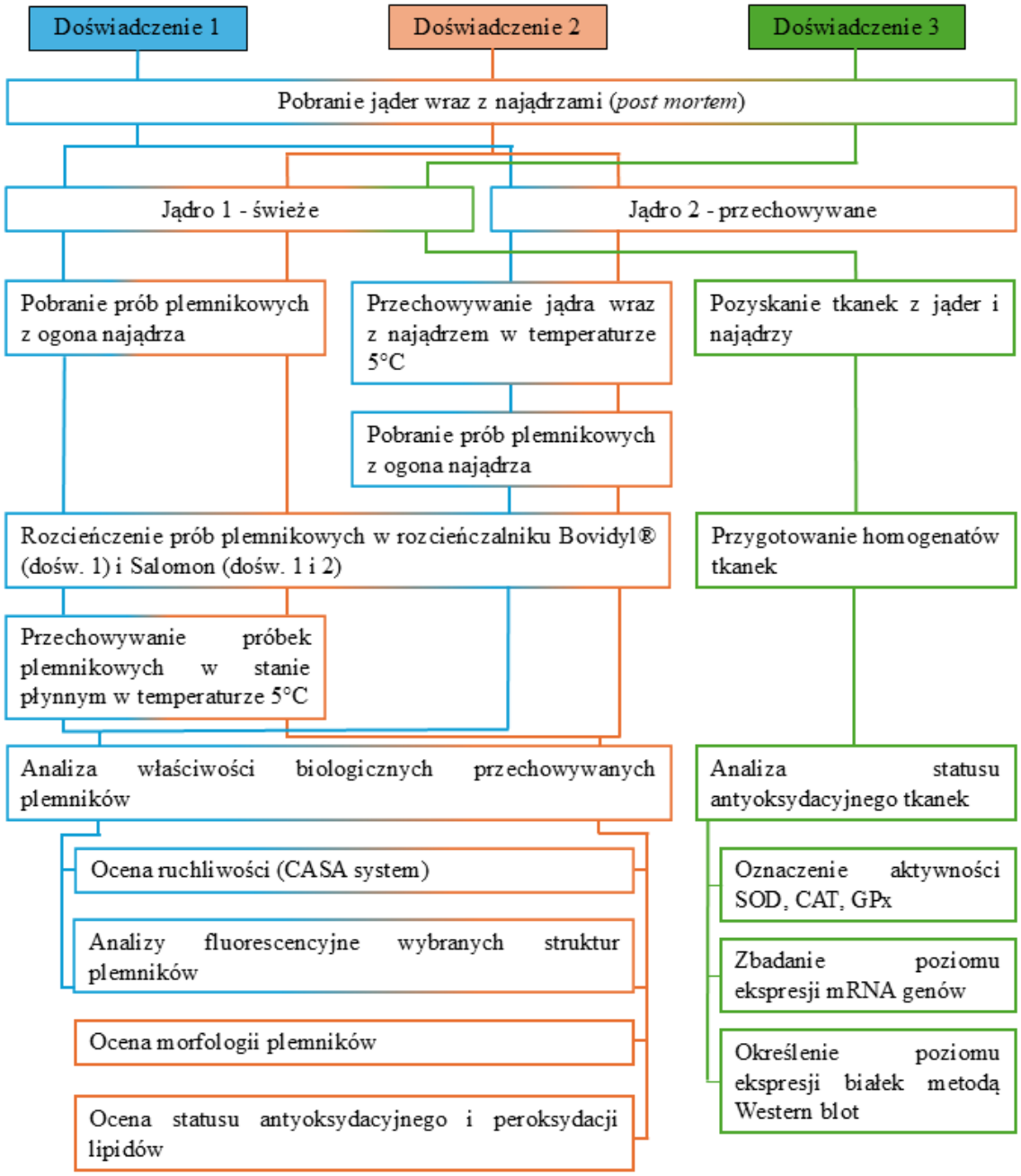
Biorąc pod uwagę wcześniejsze doniesienia dotyczące wolnożyjących zwierząt w przeprowadzonych badaniach założono, że sezon rozrodczy może wpływać na status antyoksydacyjny jąder i najądrzy (głowa, trzon i ogon) jelenia europejskiego.

3. Cele badawcze

Powyższe hipotezy posłużyły do sformułowania głównego celu dysertacji jakim była ocena właściwości biologicznych plemników najądrzowych jelenia europejskiego przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach oraz ocena wpływu sezonu na status antyoksydacyjny tkanek układu rozrodczego. Cel główny zrealizowano poprzez realizację celów szczegółowych:

1. Porównano właściwości biologiczne plemników najądrzowych jelenia europejskiego przechowywanych w stanie płynnym oraz w najądrzach w temperaturze 5°C. W plemnikach przechowywanych do 144 godzin analizowano ruchliwość plemników, integralność błon plazmatycznych i akrosomalnych, zmiany apoptotyczne, aktywność mitochondriów oraz integralność DNA. W badaniu uwzględniono także wpływ rozcieńczalnika na właściwości biologiczne plemników.
2. Oceniono wpływ czasu przechowywania na ruchliwość, żywotność, morfologię i aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz peroksydację lipidów plemników przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach w temperaturze 5°C.
3. Zbadano wpływ okresu rozrodczego (sezonu rozrodczego i okresu poza sezonem rozrodczym) na status antyoksydacyjny jąder i najądrzy z uwzględnieniem ich poszczególnych odcinków (głowy, trzonu i ogona). Cel ten osiągnięto poprzez analizę aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz określenie względnej ilości mRNA genów SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5 i CAT. Obecność wyżej wymienionych białek określono również metodą Western blot.

4. Zakres badań



Schemat 1. Etapy przeprowadzonych badań w ramach cyklu publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską. Źródło: opracowanie własne.

5. Materiał i metody

5.1. Materiał badawczy i przygotowanie prób do badań

Materiał badawczy stanowiły plemniki najądrzowe jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*). Materiał w postaci jąder wraz z najądrzami w workach mosznowych został pozyskany *post mortem* od 79 osobników, które odstrzelono podczas legalnych polowań prowadzonych w sezonie rozrodczym (wrzesień–październik) oraz poza sezonem rozrodczym (grudzień–luty). Polowania odbywały się zgodnie z zasadami gospodarki łowieckiej prowadzonej w Nadleśnictwie Nowe Ramuki (województwo warmińsko-mazurskie, Polska). Plany polowań były zgodne z polskim rozporządzeniem w sprawie polowań, ustawą z dnia 13 października 1995 r. (Prawo łowieckie) dotyczącej ochrony zwierząt łownych (zwierzyny) i gospodarowania ich zasobami w zgodzie z zasadami ekologii oraz zasadami racjonalnej gospodarki rolnej, leśnej i rybackiej, która po nowelizacji jest zgodna z rozporządzeniem Unii Europejskiej. Materiał został pobrany do 5 godzin po odstrzale i przewieziony do laboratorium Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Do badań wykorzystano próby plemnikowe pozyskane z ogona najądrzy, które zostały pobrane według metody opisanej wcześniej przez Dziekońską i in. (2020). Dodatkowo pobrano tkanki z poszczególnych odcinków układu rozrodczego, tj. jądra oraz głowy, trzonu i ogona najądrzy.

Każda pobrana próba plemnikowa została poddana standardowej ocenie. Oceniono koncentrację plemników z wykorzystaniem komory Bürker (Equimed-Medical Instruments, Kraków, Polska) pod mikroskopem świetlnym (Olympus BX41TF, Tokio, Japonia). W celu określenia koncentracji plemników świeżą próbę plemnikową rozrzedzono 0,85% NaCl w stosunku 1:800. W każdej próbie plemnikowej została oceniona ruchliwość metodą mikroskopową (Giżejewski, 2004). Do badań wykorzystano próby o ruchliwości plemników powyżej 70%.

W publikacji 1. (P1) plemniki były przechowywane w stanie płynnym (wariant I) oraz w najądrzach (wariant II) przez 144 godziny w temperaturze 5°C. Plemniki najądrzowe przeznaczone do przechowywania w stanie płynnym pobrano od każdego osobnika z jednego z najądrzy. Po standardowej ocenie świeżego nasienia, próby plemnikowe podzielono na dwie części i rozrzedzono (100×10^6 plemników/ml) w rozcieńczalnikach Bovidyl® (Minitub

GmbH, Tiefenbach, Niemcy) i Salomon (Tris (2,70%, v/v), fruktoza (1%), kwas cytrynowy (1,4%) i żółtko jaja (20%, v/v)) (Fernández-Santos i in., 2006).

Rozrzedzone próby plemnikowe inkubowano najpierw przez dwie godziny w temperaturze pokojowej. Następnie umieszczono je w lodówce w temperaturze 5°C. Drugie jądro wraz z najądrzem przechowywano w jego naturalnym środowisku, w worku mosznowym. Jądra podzielono na trzy grupy i przechowywano w lodówce przez: 48 godzin, 96 godzin i 144 godziny. Po tym czasie pobrano próbki plemników z ogona najądrza, poddano standardowej ocenie i rozrzedzono w dwóch rozcieńczalnikach: Bovidyl® i rozcieńczalniku Salomon.

W publikacji 2. (P2) do badań wykorzystano próby plemnikowe pobrane z jednego ogona najądrzy przechowywane w stanie płynnym oraz z przechowywanych najądrzy. Po standardowej ocenie prób plemnikowych każda próba została rozrzedzona do koncentracji 100 × 10^6 plemników/ml w rozcieńczalniku Salomon (Fernández-Santos i in., 2006). Procedura przechowywania plemników była taka sama jak powyżej (P1).

W publikacji 3. (P3) materiał stanowiły tkanki z jądra, głowy, trzonu i ogona najądrza zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze –80°C do dalszych analiz. Ponadto próby tkanek do analizy ekspresji genów zostały zabezpieczone w 1 ml TRI-Reagent (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Każda tkanka została pobrana od każdego osobnika w porównywalnej ilości około 1 cm^3, niezależnie od pory roku.

W celu wykonania Real-Time PCR tkanki zhomogenizowano w probówkach Lysing Matrix Tubes (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) zawierających 1 ml odczynnika TRI-Reagent w aparacie FastPrep-24 (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) przez 45 sekund. Po homogenizacji z każdej próby zostało wyizolowane RNA za pomocą zestawu Total RNA Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) według procedury opisanej przez producenta. Jakość RNA została zmierzona jako stosunek absorbancji 260:280.

Białko z tkanek zostało wyekstrahowane z wykorzystaniem buforu TKM (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA) w celu przeprowadzenia analizy Western Blot. Tkanki wstępnie roztarto w ciekłym azocie za pomocą schłodzonego moździerza i tłuczka, a następnie zawieszono w buforze TKM i poddano homogenizacji przez 45 sekund. W kolejnym etapie do prób dodano bufor TKM (wzbogacony 1% Triton X-100) i wirowano przy 8 000 × g w temperaturze 4°C przez 10 minut. Uzyskane supernatanty przechowywano w temperaturze –20°C. W każdej próbie zmierzono stężenie całkowite białka metodą Bradford (1976).

5.2. Metody badawcze

W cyklu publikacji wykorzystano wiele metod badawczych związanych z oceną jakości pozyskanych plemników najądrzowych oraz oceną statusu antyoksydacyjnego plemników oraz tkanek, które zostały opisane poniżej.

5.2.1. Analiza parametrów ruchu plemników najądrzowych

W publikacji 1. i 2. wykonano analizę parametrów ruchu plemników. Każdą próbę plemnikową przed analizą rozrzedzono roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami firmy Dulbecco (DPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) w stosunku 1:4 w celu uzyskania koncentracji plemników 20-30 × 10^6 plemników/ml, a następnie ogrzewano je przez około 5 minut w temperaturze 37°C na termobloku (Thermo Block TDR-120, Getynga, Niemcy). Porcję każdej próby plemnikowej (5 µl) umieszczano we wstępnie ogrzanej komorze Maklera (Sefi-Medical Instruments Ltd., Hajfa, Izrael) w temperaturze 37°C. Próby plemnikowe oceniano z wykorzystaniem komputerowego systemu CASA oraz analizatora nasienia Hamilton Thorne IVOS wersja 12.3 (Hamilton Thorne Bioscience, Beverley, MA, USA).

Do oceny parametrów ruchu plemników wykorzystano ustawienia oprogramowania zalecane przez producenta do analizy plemników gazeli/jelenia, tj. liczba klatek na sekundę – 60, częstotliwość odświeżania – 60 Hz, minimalny kontrast komórek – 60, minimalny rozmiar komórek – 5 pikseli, próg prostoliniowości – 80%, dolny próg VAP – 21,9 µm/s, dolny próg VSL – 6 µm/s. Przeanalizowano następujące parametry ruchu: odsetek plemników wykazujących ruch (TMOT, %), odsetek plemników wykazujących ruch postępowy (PMOT, %, plemniki o ruchu postępowym zdefiniowano jako komórki o VAP > 75 µm/s, STR > 80%), uśredniona droga przebyta przez plemnik w jednostce czasu (VAP, µm/s), droga przebyta przez plemnik ruchem prostoliniowym w jednostce czasu (VSL, µm/s), rzeczywista droga przebyta przez plemnik w jednostce czasu (VCL, µm/s), amplitudę bocznych wychyleń główki (ALH, µm), częstotliwość z jaką główka plemnika przecina drogę uśrednioną (BCF, Hz), prostoliniowość ruchu (STR, %) oraz liniowość ruchu (LIN, %).

5.2.2. Ocena żywotności plemników

W publikacji 1. ocenę integralności błony plazmatycznej plemników przeprowadzono za pomocą barwienia fluorescencyjnego dwoma barwnikami SYBR-14 i jodku propidyny (PI) (Live/Dead Sperm Viability Kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Procedura barwienia została opisana wcześniej przez Dziekońską i in. (2020). 20 µl każdej z prób plemnikowych (100 × 10^6 plemników/ml) rozrzedzono 180 µL DPBS. Następnie dodawano 2 µl 1 mM

roztworu SYBR-14 w roztworze HEPES-BSA (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 14 mM fruktoza, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl, 0,5 mM MgCl, 0,1% BSA, pH 7,4) i 2 µl PI (2,4 µM w roztworze soli Tyrode'a) i inkubowano przez 10 minut w 37°C (Thermo Block TDR-120). Wybarwione próby plemnikowe analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus BX 41, Tokio, Japonia) przy powiększeniu 600 ×. W każdej próbie policzono co najmniej 200 komórek rozrodczych. Główki plemników z zieloną fluorescencją były oceniane jako żywe plemniki z integralną błoną plazmatyczną, natomiast plemniki z czerwoną fluorescencją w obrębie główki były klasyfikowane jako plemniki martwe.

W publikacji 2. ocenę żywotności plemników przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporationn, Austin, Texas, USA). Próby do analiz przygotowano z wykorzystaniem zestawu Muse Count & Viability Kit (Luminex Corporationn, Austin, Texas, USA), zgodnie z zaleceniami producenta. Zestaw zawiera reagent, który w swoim składzie ma dwa barwniki. Jeden z nich przenika przez błonę komórkową i barwi DNA, dzięki czemu oddzielane są komórki z jądrem od komórek niejądrowych i zanieczyszczeń. Natomiast drugi barwnik na bazie 7-aminoaktynomycyny D (7-AAD) barwi wyłącznie komórki z uszkodzoną błoną komórkową. Zastosowanie kombinacji tych dwóch barwników pozwala na wyróżnienie w analizie dwóch populacji komórek: żywe i martwe. W celu przygotowania prób do analiz, każdą próbę plemnikową rozrzedzano DPBS do uzyskania koncentracji 1×10^6 - 1×10^7 plemników/ml. Następnie 20 µl próby dodawano do 380 µl odczynnika Muse Count & Viability Kit i inkubowano ją 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dokonano pomiaru żywotności plemników z wykorzystaniem aparatu Muse® Cell Analyzer.

5.2.3. Ocena aktywności mitochondriów

W publikacji 1. przeprowadzono badania dotyczące oceny aktywności mitochondriów w plemnikach (potencjał błony mitochondrialnej; MMP) zostały wykonane z wykorzystaniem fluorochromów JC-1 i PI (Molecular Probes, Eugene, USA) zgodnie z wcześniej opisaną metodą (Dziekońska i in., 2022b). Próby plemnikowe o objętości 20 µl (100 x 10^6 plemników/ml) rozrzedzono w 180 µl DPBS. Następnie tak przygotowane próby inkubowano z 1 µl roztworu JC-1 (1 mg JC-1/ml bezwodnego sulfotlenku dimetylu, DMSO) przez 15 minut w 37°C. Po tym czasie dodawano 1 µl PI (roztwór 2 µM PI) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C. Ocenę plemników przeprowadzono pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus BX 41, Tokio, Japonia) przy powiększeniu 600 ×. Oceniono co najmniej 200 plemników. Plemniki z pomarańczową fluorescencją w obrębie wstawki i zieloną fluorescencją

główki uznano za żywe z wysokim MMP (aktywne mitochondria, JC-1^+/PI^-). Natomiast plemniki z zieloną fluorescencją w obrębie wstawki i czerwoną fluorescencją główki uznano za plemniki nieżywe i o niskim MMP.

5.2.4. Ocena integralności błony akrosomalnej

Ocena integralności błony akrosomalnej plemników w publikacji 1. została wykonana metodą fluorescencyjną z wykorzystaniem aglutyniny orzeszków ziemnych (*Arachis hypogaea*) znakowanej FITC (FITC-PNA; Sigma, Saint Luis, Missouri, USA) zgodnie z wcześniej opisaną metodą przez Lange-Consiglio i in. (2013) z pewnymi modyfikacjami (Dziekońska i in., 2020). 20 µl każdej próby plemnikowej (100 × 10^6 plemników/ml) rozrzedzono 180 µL DPBS i dodawano 1 µl JC-1. Próby inkubowano przez 15 minut w 37°C. Następnie dodawano 2 µl roztworów FITC-PNA (1 mg FITC-PNA/ml PBS) i 2 µl PI i inkubowano 5 minut w 37°C. Pod koniec inkubacji dodawano 10 µl 10% roztworu formaliny w celu utrwalenia plemników. Następnie pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus BX 41, Tokio, Japonia) przy powiększeniu 600 × oceniano co najmniej 200 plemników w losowo wybranych polach preparatu. W analizie wyróżniono cztery subpopulacje plemników (Dziekońska i in., 2022b). Wynik przedstawiono jako odsetek plemników z integralną błoną akrosomalną (FITC-PNA^-/PI^-).

5.2.5. Ocena zmian apoptotycznych i żywotności plemników

W publikacji 1. oceniano żywotność plemników i ich zmiany apoptotyczne z wykorzystaniem Vybrant Apoptosis Assay Kit # 4 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) zgodnie z wcześniej opisaną metodą przez Dziekońską i in. (2022a). W celu uwidocznienia wszystkich komórek najpierw do 20 µl próby plemnikowej (rozrzedzonej wcześniej w 180 µl DPBS) dodawano 1 µl JC-1 i inkubowano przez 10 minut w 37°C. Następnie dodawano 2 µl roztworu YO-PRO-1 i 2 µl roztworu PI, i próby ponownie inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C. Pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus, model BX41, Tokio, Japonia) przy powiększeniu 600 × analizowano co najmniej 200 komórek. Wyróżniono cztery populacje plemników: plemniki niewybarwione (YO-PRO-1^-/PI^-) określone jako plemniki żywe bez zmian apoptotycznych, plemniki z zieloną główką (YO-PRO-1^+/PI^-) identyfikujące komórki ze zmianami apoptotycznymi, plemniki o zielono-czerwonych główkach (YO-PRO-1^+/PI^+) określone jako plemniki we wczesnym stadium nekrozy oraz plemniki z czerwonymi główkami (YO-PRO-1^-/ PI^+) tj. plemniki martwe (nekrotyczne).

5.2.6. Ocena integralności DNA

W publikacji 1. wykonano także ocenę integralności DNA według metody opisanej przez Partyka i in. (2017). Do 50 µl próby plemnikowej dodawano 200 µl buforu lizującego (0,1%, v/v, Triton X-100, 0,15 M NaCl, 0,08 M HCl, pH 1,4). Próby pozostawiono w temperaturze pokojowej w ciemności na 30 sekund. Następnie do prób dodawano 600 µl roztworu oranżu akrydyny (AO) (6 µg AO/ml w buforze: kwas cytrynowy 0,1 M, Na_2HPO_4 0,2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, pH 6) i próby ponownie pozostawiano na 3 minuty w ciemności. W próbie analizowano co najmniej 200 plemników pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus BX 41, Tokio, Japonia) przy powiększeniu 600 ×. W analizie obserwowano plemniki z zieloną fluorescencją w obrębie główki określane jako plemniki z integralnym DNA oraz z pomarańczową lub czerwoną fluorescencją w obrębie główki identyfikujące plemniki z uszkodzonym DNA (Dziekońska i in., 2023).

5.2.7. Ocena morfologiczna plemników

W publikacji 2. sprawdzono morfologię plemników najądrzowych dzięki barwieniu rozmazów metodą Giemsy (Watson, 1975). W celu wykonania rozmazu 10 µl próby plemnikowej (uprzednio rozrzedzonej roztworem DPBS w stosunku 1 do 4) nanoszono na szkiełko podstawowe, rozprowadzano ją po całym szkiełku i zostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Wysuszone rozmazy utrwalano w buforze formalinowym przez 15 minut, przepłukiwano je wodą i pozostawiano do wyschnięcia. Następnie rozmazy barwiono w mieszaninie barwiącej Giemsy przez 180 minut. Preparaty płukano wodą destylowaną i suszono. Dla każdej próby policzono 200 komórek plemnikowych pod mikroskopem z kontrastem fazowym przy powiększeniu 1000 × z wykorzystaniem olejku imersyjnego. Podczas analizy zliczono plemniki o prawidłowej budowie, plemniki z nieuszkodzonym akrosomem, plemniki z wadami główki, witki i wstawki oraz plemniki z obecnymi kroplami proksymalnymi i dystalnymi.

5.2.8. Ocena aktywności enzymów antyoksydacyjnych

W publikacji 2. oraz 3. wykonano ocenę aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Ocenę aktywności enzymów antyoksydacyjnych wykonano w plemnikach świeżo pobranych oraz w 2, 4 i 6 dniu ich przechowywania. Do Eppendorf pobrano 0,5 ml prób plemnikowych (100×10^6 plemników/ml), a następnie dodawano 0,5 ml 0,85% NaCl w celu uzyskania koncentracji 50×10^6 plemników/ml. Próby przemyto dwukrotnie 0,85% NaCl (3 000 × g,

5 minut, 10°C). Następnie uzyskany nadsącz zlewano, a osad zawieszano w 1 ml 0,85% NaCl. Tak przygotowane próby mrożono w –80°C.

Uzyskane osady plemnikowe homogenizowano w aparacie FastPrep®-24 (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Po homogenizacji próby odwirowano 12 000 × g przez 15 minut w temperaturze 10°C, a uzyskany klarowny nadsącz przeniesiono do nowych Eppendorf i przechowywano w temperaturze –80°C do dalszych analiz. W każdej próbie została zmierzona całkowita zawartość białka metodą Bradford (1976).

W celu oceny aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach (P3) zebrane próby zhomogenizowano w buforze do ekstrakcji tkanek (50 mM Tris, 5 mM kwas etylenodiaminotetraoctowy – EDTA, 1 mM ditiotreitol – DDT, 1 µg/ml aprotynina, pH 7,5) w probówkach Lysing Matrix Tubes (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) w aparacie FastPrep-24 (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) przez 45 sekund. Homogenaty zostały odwirowane w 15 000 × g przez 15 minut w temperaturze 4°C, w celu uzyskania klarownego nadsączu. W każdej próbie oznaczono całkowitą zawartość białka metodą Bradford (1976). Próby przechowywano w temperaturze –80°C do dalszych analiz.

Aktywność poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych została wyrażona w plemnikach w U/10^6 plemników, a w tkankach w U/mg białka. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych została oznaczona z wykorzystaniem spektofotometru Beckman Coulter DU 800 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

5.2.8.1. Dysmutaza ponadtlenkowa

Próby do analizy aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) przygotowano z wykorzystaniem zestawu Ransod (Randox Laboratories, Crumlin, UK), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Aktywność SOD została zmierzona przy długości fali 505 nm. Jedna jednostka SOD odpowiada za 50% inhibicji szybkości redukcji chlorku 2-(4-jodofenylo)-3-(4-nitrofenolo)-5 fenylotetrazoliowego (INT) w temperaturze 37°C i pH 7.

5.2.8.2. Peroksydaza glutationowa

Aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) została zmierzona spektofotometrycznie z wykorzystaniem komercyjnego testu Ransel (Randox Laboratories, Crumlin, UK) według instrukcji producenta. Aktywność GPx została zmierzona przy długości fali świetlnej 340 nm. Jedna jednostka GPx to ilość tego enzymu, która katalizuje utlenianie 1 µM NADPH na minutę w temperaturze 37°C i pH 7,2.

5.2.8.3. Katalaza

Aktywność katalazy została zmierzona z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, USA), zgodnie z instrukcją producenta. Pomiar aktywności tego enzymu polegał na określeniu ilość H_2O_2 pozostałego z reakcji katalizowanej przez CAT. Aktywność CAT została zmierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 520 nm. Jedna jednostka CAT to ilość tego enzymu, która rozkłada 1 µM H_2O_2 na minutę w temperaturze 25°C i pH 7.

5.2.9. Poziom dialdehydu malonowego

Peroksydację lipidów w błonie komórkowej plemników oceniano za pomocą spektrofotometrycznego pomiaru wytwarzanego dialdehydu malonowego (MDA) przy użyciu komercyjnego testu BIOXYTECH® MDA-586TM Assay Kit (OxisResearch, Burlingame, CA) według instrukcji producenta. Pomiar wykonano przy długości fali świetnej 586 nm. Wynik przedstawiono jako ilość µM MDA/10^6 plemników.

5.2.10. Ekspresja genów

5.2.10.1. Odwrotna transkrypcja

W publikacji 3. wykonano reakcję odwrotnej transkrypcji z użyciem RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano 1 µg RNA każdej próby, a cDNA było syntetyzowane w PCR Thermal Cycler (MJ Mini Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornia, USA). Etapy reakcji były następujące: 25°C przez 10 minut, 42°C przez 60 minut, 70°C przez 5 minut, a następnie utrzymanie 4°C. Uzyskane jednoniciowe DNA zostało rozcieńczone wodą wolną od nukleaz (1:9) i wykorzystane do analizy PCR w czasie rzeczywistym.

5.2.10.2. Real-Time PCR

Uzyskane cDNA użyto do reakcji qPCR w systemie Real-Time PCR ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zgodnie z wcześniej opisaną metodą (Koziorowska-Gilun i in., 2013) z modyfikacjami własnymi. Mieszanina reakcyjna składała się z 2 µl matrycy cDNA, 5 µl starterów (Forward i Reverse), 12,5 µl Maxima SYBR/ROX PCR Mix (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) oraz 5,5 µl wody wolnej od nukleaz. Cykl rozpoczęto w temperaturze 95°C przez 10 minut w celu aktywowania polimerazy DNA typu Hot Start. Proces reakcji PCR obejmował 40 powtórzeń, wg schematu: denaturacja - 95°C

przez 15 sekund, następnie przyłączenie starterów i elongacja w temperaturze 60°C przez 60 sekund. Każdą próbę badano w dwóch powtórzeniach. Startery zostały zaprojektowane przy pomocy programu Primer Express Software v 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) na podstawie genomu jelenia szlachetnego (Tabela 1). Ekspresję analizowanych genów (SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5 oraz CAT) określono ilościowo, porównując ich względną ilość mRNA z genem referencyjnym (SDHA), który wybrano ze względu na jego wyższą stabilność w analizowanych tkankach, w porównaniu z innymi testowanymi genami referencyjnymi, w tym β-aktyną (ACTB), GAPDH i 18S rRNA. Względną ilość mRNA określono, porównując ilość mRNA dla analizowanych genów (SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5 oraz CAT) z ilością dla genu referencyjnego (SDHA) i wyrażono jako ilość bezwzględną z wykorzystaniem algorytmu Real Time PCR Miner (Zhao i Fernald, 2005).

Tabela 1. Sekwencje syntetycznych starterów użytych do badania ekspresji genów w tkankach układu rozrodczego jelenia europejskiego metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) w czasie rzeczywistym. Każdy zestaw starterów został zaprojektowany zgodnie z numerem dostępowym podanym w bazie danych Europejskiego Laboratorium Biologii Molekularnej.

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Accession Number
SDHA	GACAGGAGCCCGCAGTTTT	CACGGCATCAAACTCATGGT	XM_043887904.1
SOD1	CTCCTTTTCCCCGAGTCATG	CGACGACTGTATTTCCCTTTGC	XM_043892610.1
SOD2	TCTGCAGCCTGCGTTAAAGTT	CTTCCAGCAATTCCCCTTTG	XM_043888243.1
SOD3	CGCTGCTCTGTGCCTATCTG	TGTGCATGTCGCGGATCT	XM_043870913.1
GPx4	TACGCCGAGTGTGGTTTACG	GCGGCGAACTCTTTGATCTC	XM_043912658.1
GPx5	TGACATCCGCTGGAATTTTG	ACTGACGGGAGTCCGATGAA	XM_043908264.1
CAT	TGCCCTATTGTTTCCGTCCTT	ACCATGTCCGGATCCTTCAG	XM_043909065.1

SDHA – gen referencyjny, dehydrogenaza bursztynianowa; SOD1 – dysmutaza ponadtlenkowa 1; SOD2 – dysmutaza ponadtlenkowa 2; SOD3 – dysmutaza ponadtlenkowa 3; GPx4 – peroksydaza glutationowa 4; GPx5 – peroksydaza glutationowa 5; CAT – katalaza. Źródło: P3

5.2.10.3. Western blot

5.2.10.3.1. SDS PAGE

Elektroforezę wykonano w 15% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS (Laemmli, 1970) i przeprowadzono w aparacie Mini-Protean II Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) w buforze do elektroforezy Tris-Glycine (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). Każda próba zawierała 20 µg białka oraz 2 µl buforu obciążającego (1 M Tris-HCl, 20%

SDS, 20% glicerol, 2% β-merkaptoetanol, 2% błękit bromofenolowy, pH 6,8), tak przygotowane próby umieszczano w studzienkach.

5.2.10.3.2. Półsuchy transfer białek

Po wykonaniu elektroforezy białka transferowano na membranę Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) w aparacie do transferu Pierce Power Blot system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Po transferze membranę blokowano w roztworze 5% odtłuszczonego mleka w buforze TBS-T (1 M Tris, 5 M NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20) przez noc w temperaturze 4°C.

5.2.10.3.3. Inkubacja przeciwciał

Do detekcji badanych białek użyto specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych:

- królicze poliklonalne przeciwciało anty-SOD1 (1:10 000; PA5-23245; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- królicze poliklonalne przeciwciało anty-SOD2 (1:1 000; PA1-31072; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- królicze poliklonalne przeciwciało anty-SOD3 (1:1 000; PA5-93329; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- królicze poliklonalne przeciwciało anti-glutathione peroxidase 4 (1:1 000; ab41787; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania);
- królicze poliklonalne przeciwciało anty-GPx5 (1:500; PA5-102342; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- królicze poliklonalne przeciwciało anti-CATALASE (1:15 000; 200-401-051; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- mysie monoklonalne przeciwciało anty-beta actin (C4) (1:200; sc-47778; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

Membrany inkubowano przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc w temperaturze 4°C. Następnie membrany przemywano i inkubowano z drugorzędowymi przeciwciałami kozie anty-królicze IgG sprzężone z HRP (1:15 000; sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Prążki białkowe uwidoczniono chemiluminescencyjnie w aparacie ChemiDoc (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) z wykorzystaniem SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate.

5.3. Analiza statystyczna

W publikacji 1. analiza statystyczna uzyskanych wyników została wykonana z wykorzystaniem programu Statistica wersja 12.5 (StatSoft Incorporation, Tulsa, OK, USA). Do określenia normalności rozkładu zebranych danych zastosowano test Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji oceniono za pomocą testu Levene'a. Uzyskane dane parametryczne zostały porównane z wykorzystaniem analizy wariancji (ANOVA). Natomiast dane nieparametryczne sprawdzono za pomocą testów Kruskala-Wallisa i Dunna. Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnia ± błąd standardowy średniej (SEM). Istotne efekty główne porównano za pomocą testu *post hoc* Bonferroniego przy $p \leq 0,05$. Dodatkowo wykonano analizę korelacji między wybranymi zmiennymi w każdym wariancie przechowywania, uwzględniając czas przechowywania (144 godziny) i zastosowanym rozcieńczalnikiem, określono poprzez obliczenie współczynników korelacji rang Spearmana.

W publikacji 2. dane opracowano statystycznie w programie Statistica wersja 12.5 (StatSoft Incorporation, Tulsa, OK, USA). Normalność rozkładu zebranych danych sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ze względu na różną ilość prób (n) w porównywanych grupach oraz brak rozkładu normalnego danych do analizy wykorzystano testy nieparametryczne. W celu określenia obecności istotnych statystycznie różnic pomiędzy czasem przechowywania w każdym wariancie oraz pomiędzy wariantami przechowywania w dniach D2, D4 i D6 wykonano test U Manna-Whitneya w celu porównania dwóch niezależnych prób. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SEM. Dodatkowo wykonano analizę korelacji ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$) pomiędzy zmiennymi w każdym wariancie przechowywania a czasem przechowywania, obliczając współczynnik korelacji rang Spearmana. Wyniki analizy korelacji przedstawiono dla szóstego dnia przechowywania (D6) (materiały uzupełniające artykułu naukowego).

W publikacji 3. wyniki opracowano statystycznie w programie Statistica wersja 14.1.0.4 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Normalność rozkładu danych zweryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Dane o rozkładzie innym niż normalny przekształcono za pomocą transformacji Boxa-Coxa. Wpływ sezonu na badane parametry porównano za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA), a istotność statystyczną ($p \leq 0,05$) zweryfikowano za pomocą testu *post hoc* Bonferroniego. Wyniki wyrażono jako wartości średnie ± SEM.

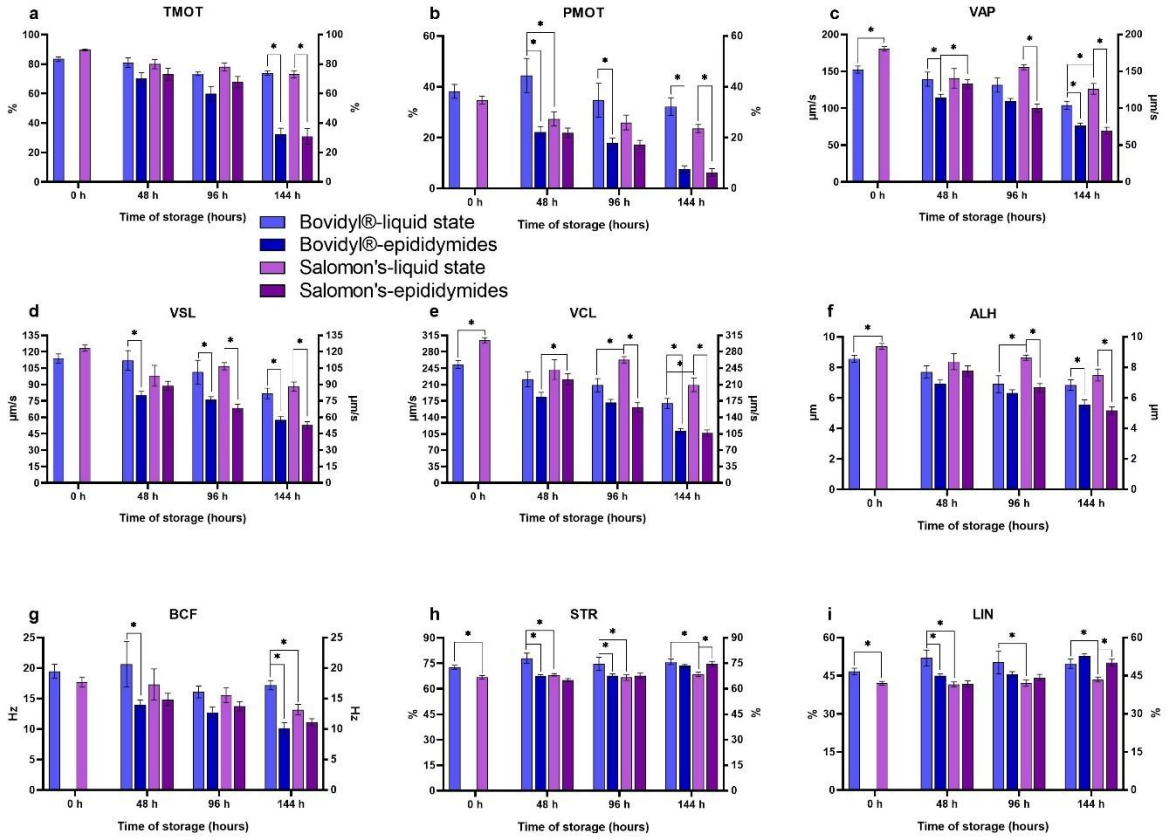
6. Wyniki

Publikacja 1 (P1): Neuman, N. M., Dziekońska, A., Orzołek, A., Gilun, P. (2024). A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5°C. *Animal Reproduction Science*, *260*, 107387. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387

1. Wpływ dwóch wariantów przechowywania na ruchliwość i parametry ruchliwości plemników

Analiza ruchliwości plemników i parametrów ruchu (Rysunek 1) wykazała, że przechowywanie w stanie płynnym korzystniej wpłynęło na plemniki w porównaniu z przechowywaniem w najądrzach niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika. Niemniej jednak dla rozcieńczalnika Bovidyl® istotne różnice pomiędzy tymi dwoma wariantami przechowywania wykazano od 48 godzinach przechowywania i dotyczyły one PMOT (Rys. 1b), VAP (Rys. 1c), VSL (Rys. 1d), BCF (Rys. 1g), STR (Rys. 1h) i LIN (Rys. 1i). W odniesieniu do rozcieńczalnika Salomon te różnice wykazano dopiero od 96 godziny przechowywania i odnotowano je także dla VAP, VSL, ale też dla VCL (Rys. 1e) i ALH (Rys. 1f). Najpóźniej istotne różnice w analizie ruchliwości wykazano dla odsetka plemników ruchliwych (TMOT) dopiero w 144 godzinach przechowywania niezależnie od użytego rozcieńczalnika. Takie same różnice niezależne od rozcieńczalnika odnotowano dla PMOT, VAP, VSL, VCL i ALH. Po 144 godzinach przechowywania wartość TMOT w najądrzach spadła poniżej 50%, podczas gdy w stanie płynnym wynosiła dalej powyżej 70%.

W analizie PMOT i parametrów ruchu wykazano także wpływ rozcieńczalnika dla przechowywania w stanie płynnym w zależności od dnia przechowywania. W 48 godzinie przechowywania plemników wykazano wyższe wartości PMOT, STR i LIN dla rozcieńczalnika Bovidyl® w porównaniu z rozcieńczalnikiem Salomon. Z kolei w pierwszym dniu przechowywania stwierdzono wyższe wartości VAP, VCL i ALH dla rozcieńczalnika Salomon w porównaniu z Bovidyl®. Podobną zależność obserwowano w kolejnych dniach konserwacji w stanie płynnym. Dla przechowywania w najądrzach nie stwierdzono istotnego wpływu rozcieńczalnika na badane zmienne ruchu, z wyjątkiem VCL i VAP w 48 godzinie przechowywania.



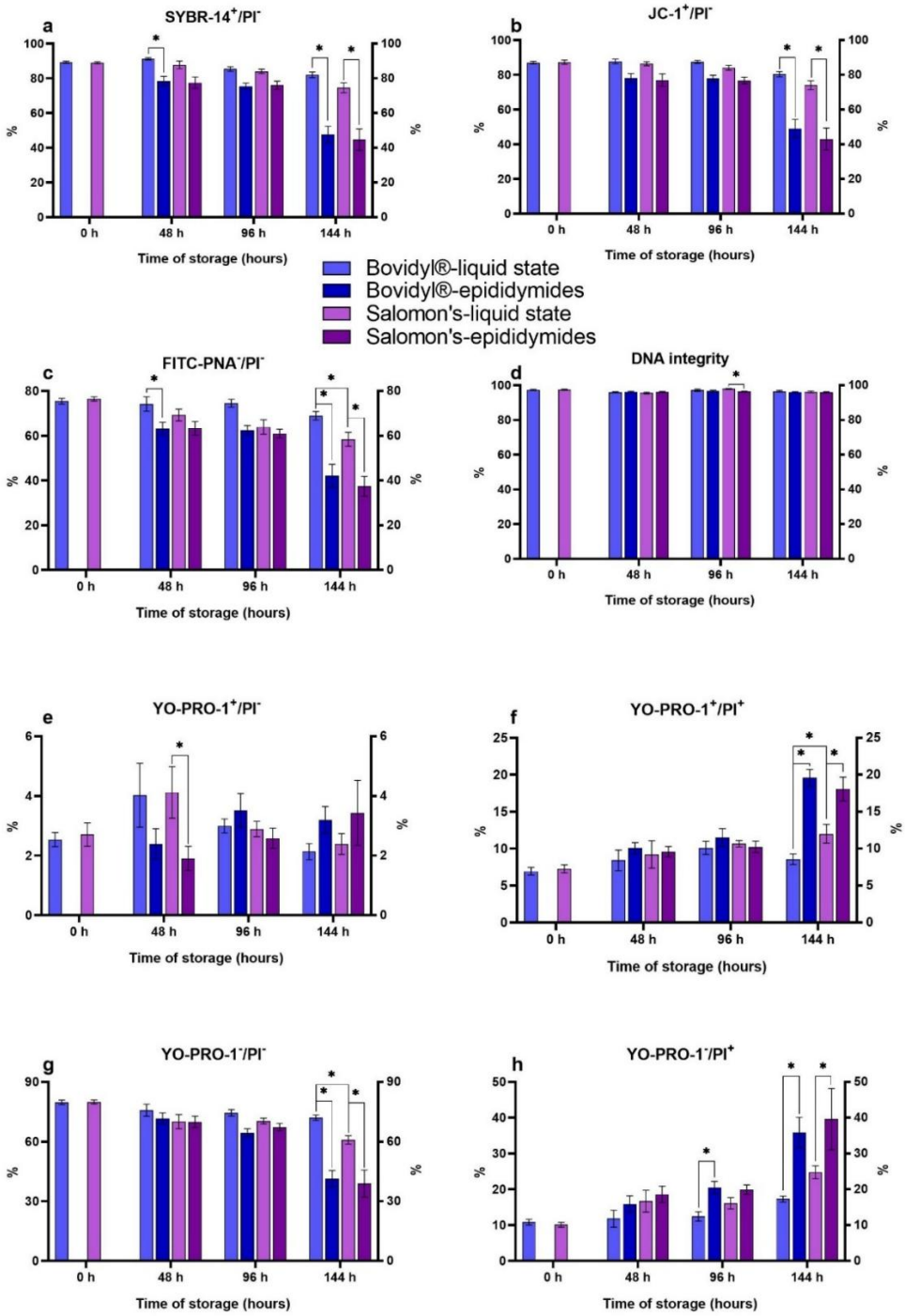
Rysunek 1. Ruchliwość i parametry ruchu plemników przechowywanych w najądrzu oraz w stanie ciekłym w temperaturze 5°C (n = 36).

(a) TMOT – odsetek plemników wykazujących ruch; (b) PMOT – odsetek plemników wykazujących ruch postępowy; (c) VAP – uśredniona droga przebyta przez plemnik w jednostce czasu; (d) VSL – droga przebyta przez plemnik ruchem prostoliniowym w jednostce czasu; (e) VCL – rzeczywista droga przebyta przez plemnik w jednostce czasu; (f) ALH – amplituda bocznych wychyleń główki; (g) BCF – częstotliwość z jaką główka plemnika przecina drogę uśrednioną; (h) STR – prostoliniowość ruchu; (i) LIN – liniowość ruchu. Przedstawiono wartości jako średnie (± SEM). * Różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0{,}05$. Źródło: P1

2. Wpływ dwóch wariantów przechowywania na żywotność plemników, integralność błony akrosomalnej, aktywność mitochondriów, integralność DNA i zmiany apoptotyczne w plemnikach

Analiza zmian integralności błon plazmatycznych (Rys. 2a), aktywności mitochondriów (Rys. 2b) oraz odsetka plemników z integralnym akrosomem (Rys. 2c) wykazała niższe wartości dla plemników przechowywanych w najądrzach w porównaniu do przechowywanych w stanie płynnym niezależnie od czasu przechowywania i rozcieńczalnika. Niemniej jednak istotne różnice pomiędzy tymi dwoma wariantami przechowywania stwierdzono dopiero w 144 godzinie przechowywania niezależnie od rozcieńczalnika. W odniesieniu do

rozcieńczalnika Bovidyl® wykazano te różnice znaczenie wcześniej, bo już w 48 godzinie przechowywania i dotyczyły one integralności plazmolemy i akrosomów. W 144 godzinie przechowywania wartości analizowanych zmiennych dla plemników przechowywanych w najądrzach spadły do około 40%, podczas gdy dla plemników przechowywanych w stanie płynnym wynosiły ok. 60%, niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika.



Rysunek 2. Integralność błon plazmatycznych, potencjał błon mitochondrialnych, integralność błon akrosomalnych, integralność DNA i zmiany o charakterze apoptotycznym w plemnikach przechowywanych w najądrzu i w stanie płynnym w temperaturze 5°C (n = 36).

(a) SYBR-14^{+}/PI^{-} – plemnik z nienaruszoną błoną plazmatyczną; (b) JC-1^{+}/PI^{-} – potencjał błony mitochondrialnej; (c) FITC-PNA^{-}/PI^{-} – plemnik z nienaruszoną błoną akrosomalną; (d) integralność DNA; (e) YO-PRO-1^{+}/PI^{-} – żywe plemniki ze zmianami o charakterze apoptotycznym; (f) YO-PRO-1^{+}/PI^{+} – plemniki obumierające; (g) YO-PRO-1^{-}/PI^{-} – żywe plemniki bez zmian o charakterze apoptotycznym; (h) YO-PRO-1^{-}/PI^{+} – plemniki martwe. Przedstawiono wartości jako średnie (± SEM). * Różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$. Źródło: P1.

Biorąc pod uwagę analizę integralności DNA (Rys. 2d), jedyne różnice istotne statystycznie odnotowano wyłącznie w 96 godzinie przechowywania pomiędzy przechowywaniem w stanie płynnym a przechowywaniem w najądrzach tylko dla rozcieńczalnika Salomon. Niemniej jednak odsetek plemników z integralnym DNA w każdym wariancie przechowywania był w miarę stabilny niezależnie od czasu przechowywania i wynosił ponad 95,5%.

Analiza plemników ze zmianami apoptotycznymi wykazała istotne różnice ($p \leq 0,05$) pomiędzy wariantami przechowywania w 48 godzinie, ale tylko dla rozcieńczalnika Salomon (Rys. 2e). Niemniej jednak znacznie więcej plemników ze zmianami apoptotycznymi obserwowano w tym czasie przechowywania dla stanu płynnego niż dla przechowywania w najądrzach niezależnie od rozcieńczalnika (odpowiednio ok. 4%, ok. 2%). Z kolei od 96 godziny przechowywania obserwowano wzrost zmian apoptotycznych plemników dla przechowywania w najądrzach w porównaniu do stanu płynnego. W 144 godzinie przechowywania wykazano istotny wzrost odsetka plemników zamierających (o podwójnej fluorescencji, wskazującej na późne zmiany apoptotyczne i wczesną nekrozę) podczas przechowywania w najądrzach (ponad 18%) w porównaniu do przechowywania w stanie płynnym (około 10%) niezależnie od użytego rozcieńczalnika (Rys. 2f). W tym czasie przechowywania wykazano też istotne różnice pomiędzy wariantami przechowywania w odsetku plemników prawidłowych i w odsetku plemników martwych (odpowiednio Rys. 2g, h) niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika. Ponadto istotne różnice w odsetku plemników martwych dla rozcieńczalnika Bovidyl® pomiędzy wariantami przechowywania wykazano także w 96 godzinie przechowywania.

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano korelacje ($p \leq 0,05$) między wybranymi parametrami określającymi jakość plemników (TMOT, PMOT, SYBR-14^{+}/PI^{-}, JC-1^{+}/PI^{-}, FITC-PNA^{-}/PI^{-}, integralność DNA, YO-PRO-1^{-}/PI^{-}, YO-PRO-1^{+}/PI^{-}, YO-PRO-1^{+}/PI^{+}, YO-PRO-1^{-}/PI^{+}) uwzględniając metodę oraz czas przechowywania 144 godziny, dla którego wykazano najwięcej różnic pomiędzy wariantami przechowywania.

3. Korelacje pomiędzy analizowanymi parametrami plemników w dwóch wariantach przechowywania

W 144 godzinie przechowywania plemników w stanie płynnym (Tabela 2) wykazano korelacje dodatnie pomiędzy odsetkiem plemników ruchliwych (TMOT) i o ruchu postępowym (PMOT) a integralnością błon plazmatycznych (odpowiednio $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$). PMOT był też dodatnio skorelowany z integralnością akrosomów (FITC-PNA$^-$/PI$^-$), która z kolei korelowała wysoko dodatnio z aktywnością mitochondriów (JC-1$^+$/PI$^-$) ($p \leq 0,001$) i odsetkiem plemników bez zmian apoptotycznych (YO-PRO-1$^-$/PI$^-$) ($p \leq 0,001$), zaś ujemnie z odsetkiem plemników zamierających (YO-PRO-1$^+$/PI$^+$) ($p \leq 0,01$) i odsetkiem plemników martwych (YO-PRO-1$^-$/PI$^+$) ($p \leq 0,001$). Wzajemne wysoko dodatnie korelacje ($p \leq 0,001$) stwierdzono pomiędzy integralnością błon plazmatycznych, aktywnością mitochondriów, integralnością akrosomów oraz odsetkiem plemników bez zmian apoptotycznych.

Podobne korelacje wystąpiły podczas przechowywania plemników w najądrzach przez 144 godziny (Tabela 3). TMOT pozytywnie wysoko korelował z PMOT ($p \leq 0,001$), który wysoko korelował z SYBR-14$^+$/PI$^-$, a ponadto z aktywnością mitochondriów, integralnością akrosomów i odsetkiem plemników prawidłowych bez zmian apoptotycznych ($p \leq 0,001$). Ujemne korelacje wystąpiły pomiędzy PMOT a odsetkiem plemników ze zmianami apoptotycznymi ($p \leq 0,05$) oraz pomiędzy TMOT i PMOT a YO-PRO-1$^-$/PI$^+$ ($p \leq 0,001$). Wzajemne istotne korelacje ($p \leq 0,001$) wystąpiły także pomiędzy integralnością błon plazmatycznych, aktywnością mitochondriów, integralnością błon akrosomalnych oraz odsetkiem plemników bez zmian apoptotycznych. Parametry te zaś ujemnie korelowały z odsetkiem plemników martwych ($p \leq 0,001$). Integralność DNA była ujemnie skorelowana z odsetkiem plemników bez zmian apoptotycznych ($p \leq 0,01$) i z odsetkiem plemników ze zmianami apoptotycznymi ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Współczynniki korelacji opisujące zależności między parametrami jakości plemników najądrzowych jelenia europejskiego przechowywanych w stanie płynnym w temperaturze 5°C przez 144 godziny.

	TMOT	PMOT	SYBR-14$^+$/PI$^-$	JC-1$^+$/PI$^-$	FITC-PNA$^-$/PI$^-$	DNA integrity	YO-PRO-1$^-$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^+$	YO-PRO-1$^-$/PI$^+$
TMOT	1	0.470*	0.609**	0.327	0.225	0.058	0.227	0.166	-0.114	-0.226
PMOT		1	0.427*	0.284	0.491*	0.198	0.402	0.078	-0.426	-0.312
SYBR-14$^+$/PI$^-$			1	0.747***	0.605**	0.172	0.699***	-0.006	-0.546**	-0.577**
JC-1$^+$/PI$^-$				1	0.658***	-0.081	0.755***	-0.142	-0.569**	-0.673***
FITC-PNA$^-$/PI$^-$					1	0.244	0.739***	-0.227	-0.508*	-0.721***
DNA integrity						1	-0.011	0.044	-0.007	0.075
YO-PRO-1$^-$/PI$^-$							1	-0.265	-0.745***	-0.902***
YO-PRO-1$^+$/PI$^-$								1	0.415*	0.052
YO-PRO-1$^+$/PI$^+$									1	0.458*
YO-PRO-1$^-$/PI$^+$										1

* Różnica istotna statystycznie dla $p \leq 0,05$; ** Różnica istotna statystycznie dla $p \leq 0,01$; *** Różnica istotna statystycznie dla $p \leq 0,001$; n = 35; TMOT, ruch całkowity (%); PMOT, ruch postępowy (%); SYBR-14$^+$/PI$^-$, plemniki z integralną błoną plazmatyczną (%); JC-1$^+$/PI$^-$, potencjał błony mitochondrialnej (%); FITC-PNA$^-$/PI$^-$, plemniki z integralną błoną akrosomalną (%); DNA integrity, plemniki z integralnym DNA (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^-$, plemniki żywe bez zmian apoptotycznych (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^-$, plemniki żywe ze zmianami apoptotycznymi (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^+$, plemniki zamierające (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^+$, plemniki nekrotyczne (%). Źródło: P1.

Tabela 3. Współczynniki korelacji opisujące zależności między parametrami jakości plemników najądrzowych jelenia europejskiego przechowywanych w najądrzach w temperaturze 5°C przez 144 godziny.

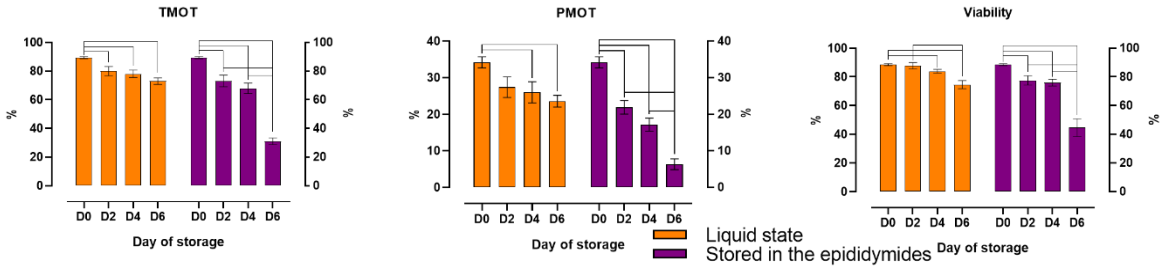
	TMOT	PMOT	SYBR-14$^+$/PI$^-$	JC-1$^+$/PI$^-$	FITC-PNA$^-$/PI$^-$	DNA integrity	YO-PRO-1$^-$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^+$	YO-PRO-1$^-$/PI$^+$
TMOT	1	0.884***	0.880***	0.723***	0.821***	-0.395	0.813***	0.390	0.330	-0.807***
PMOT		1	0.812***	0.700***	0.744***	-0.410	0.760***	0.537*	0.358	-0.764***
SYBR-14$^+$/PI$^-$			1	0.883***	0.917***	-0.395	0.893***	0.300	0.227	-0.842***
JC-1$^+$/PI$^-$				1	0.850***	-0.302	0.743***	0.294	0.168	-0.696***
FITC-PNA$^-$/PI$^-$					1	-0.479*	0.902***	0.268	0.177	-0.854***
DNA integrity						1	-0.577**	-0.508*	-0.244	0.594**
YO-PRO-1$^-$/PI$^-$							1	0.343	0.158	-0.952***
YO-PRO-1$^+$/PI$^-$								1	0.641**	-0.495*
YO-PRO-1$^+$/PI$^+$									1	-0.362
YO-PRO-1$^-$/PI$^+$										1

* Różnica istotna statystycznie dla $p \leq 0,05$; ** Różnica istotna statystycznie dla $p \leq 0,01$; *** Różnica istotna statystycznie dla $p \leq 0,001$; n =35; TMOT, ruch całkowity (%); PMOT, ruch postępowy (%); SYBR-14$^+$/PI$^-$, plemniki z integralną błoną plazmatyczną (%); JC-1$^+$/PI$^-$, potencjał błony mitochondrialnej (%); FITC-PNA$^-$/PI$^-$, plemniki z integralną błoną akrosomalną (%); DNA integrity, plemniki z integralnym DNA (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^-$, plemniki żywe bez zmian apoptotycznych (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^-$, plemniki żywe ze zmianami apoptotycznymi (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^+$, plemniki zamierające (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^+$, plemniki nekrotyczne (%). Źródło: P1.

Publikacja 2 (P2): Neuman, N. M., Orzołek, A., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Dziekońska, A. (2024). Changes in the morphology and antioxidant status of European red deer sperm stored in the epididymides and in a liquid state. *Animals*, *14*, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653

1. Wpływ czasu przechowywania na ruchliwość, żywotność, morfologię i status antyoksydacyjny plemników przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach

Czas przechowywania istotnie wpłynął na ruchliwość oraz na żywotność plemników przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach (Rys. 3). Istotny spadek wartości odsetka plemników wykazujących ruch (TMOT) wykazano już w drugim dniu (D2) przechowywania dla obu wariantów. Dla przechowywania w najądrzach w D2 wykazano także istotny spadek odsetka plemników o ruchu postępowym (PMOT) i odsetka plemników z integralną błoną plazmatyczną (Viability, żywotność). Dla przechowywania w stanie płynnym stwierdzono istotny spadek PMOT i żywotności dopiero od czwartego dnia przechowywania. Niemniej jednak w D6 dla przechowywania w stanie płynnym wartości TMOT i żywotność wynosiły powyżej 70%, zaś PMOT ok. 24%, podczas gdy dla przechowywania w najądrzach wartości te spadły odpowiednio do ok. 30-40% dla TMOT i żywotności, zaś wartości PMOT wynosiły poniżej 10%.

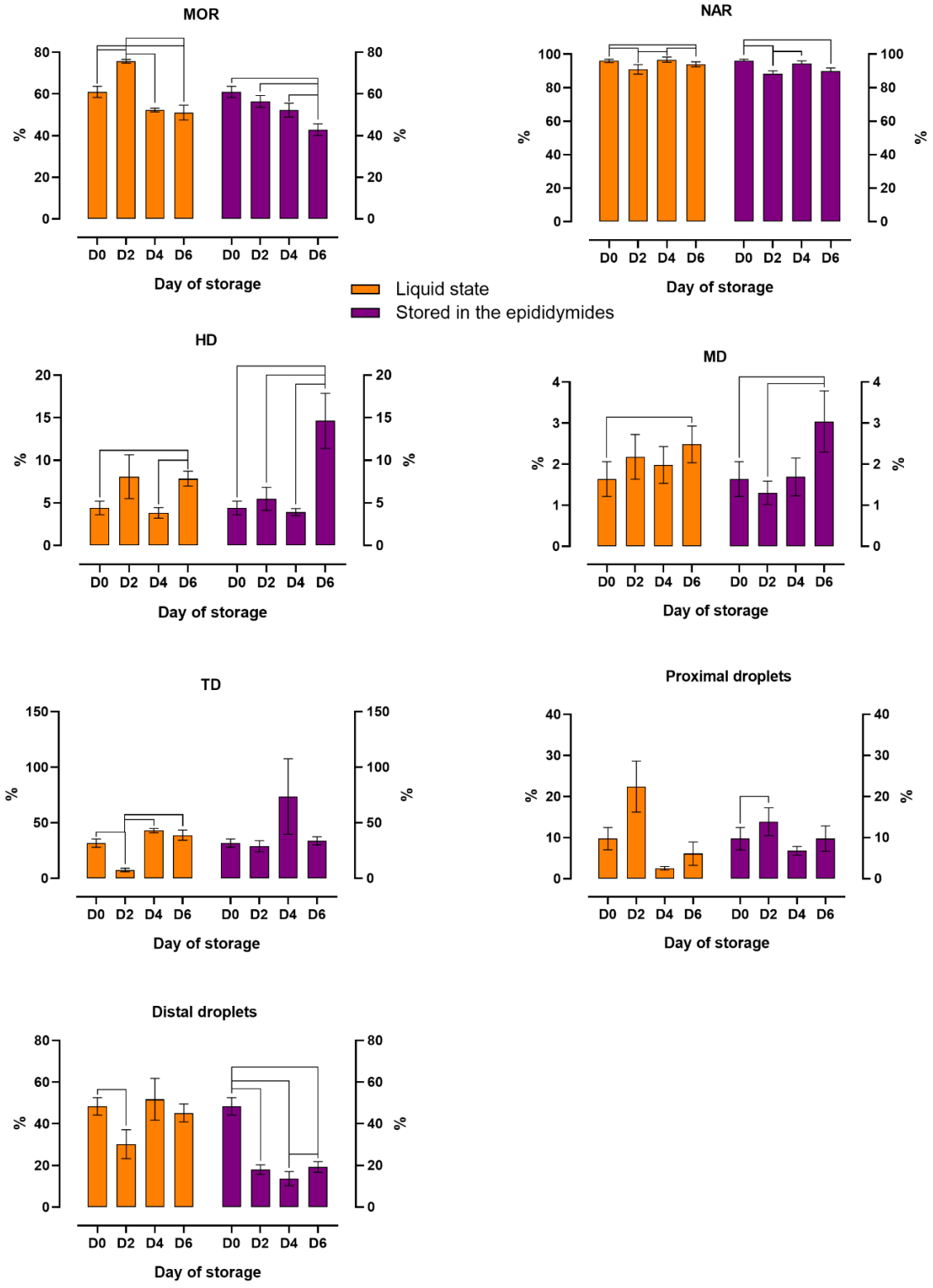


Rysunek 3. Wpływ czasu przechowywania na ruchliwość i żywotność plemników przechowywanych w stanie ciekłym i w najądrzu w temperaturze 5°C.

TMOT – odsetek plemników z ruchem całkowitym; PMOT – odsetek plemników z ruchem postępowym; Viability – odsetek plemników żywych. Przedstawiono wartości jako średnie (± SEM). Różnica istotna statystycznie dla $p \leq 0{,}05$. Źródło: P2.

Analiza zmian morfologicznych plemników przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach przez sześć dni została zaprezentowana na Rysunku 4. W analizie odsetka plemników z prawidłową morfologią (MOR) najwyższe wartości odnotowano w D2 dla przechowywania w stanie płynnym. Z upływem czasu obserwowano powolny spadek wartości MOR niezależnie od zastosowanego wariantu przechowywania. Istotne różnice dla MOR wykazano dla stanu płynnego pomiędzy D0 i D2, a następnie pomiędzy ww. dniami a D4 i D6.

W odniesieniu do przechowywania w najądrzach wykazano istotny spadek wartości MOR dopiero w D6, a wartość ta spadła do ok. 45% podczas gdy dla przechowywania w stanie płynnym wynosiła ok. 55%. Podczas przechowywania obserwowano istotne zmiany w integralności akrosomów (NAR). Dla obu wariantów przechowywania najniższe wartości NAR wykazano w D2 i D6 w porównaniu do D0. Z czasem przechowywania obserwowano wzrost odsetka plemników z wadami główki (HD), wstawki (MD) i witki (TD). Istotne różnice ($p \leq 0,05$) w analizie HD i MD wystąpiły pomiędzy D0 i D6 dla obu wariantów przechowywania. W D6 obserwowano znaczący wzrost ($p \leq 0,05$) wartości HD i MD dla przechowywania w najądrzach w porównaniu ze stanem płynnym. Z czasem przechowania wykazano też wzrost odsetka plemników z wadami witki (TD) niezależnie od wariantu przechowywania. Istotne różnice ($p \leq 0,05$) wykazano jednak tylko dla stanu płynnego pomiędzy D0 i D2 oraz pomiędzy D2 a D4 i D6. Najwyższy odsetek plemników z kroplą proksymalną (proximal droplets) stwierdzono w D2 niezależnie od wariantu przechowywania, ale istotne różnice ($p \leq 0,05$) w analizie wartości wykazano tylko dla przechowywania w najądrzach pomiędzy D0 a D2. Z czasem przechowywania wykazano spadek wartości odsetka plemników z kroplą dystalną (distal drop), zwłaszcza dla przechowywania w najądrzach (wartości spadły z ok. 48% w D0 do ok. 20% w D6). Dla obu wariantów wykazano istotne różnice ($p \leq 0,05$) w analizie odsetka plemników z kroplami dystalnymi pomiędzy D0 a D2.

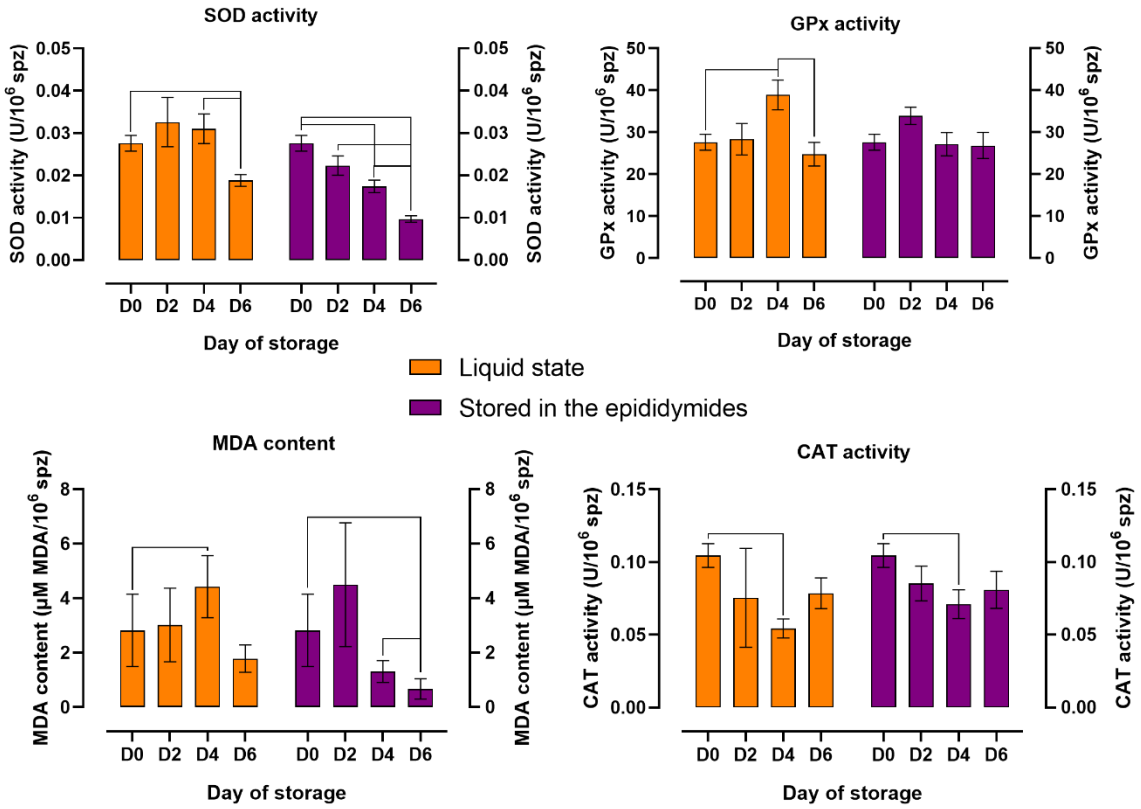


Rysunek 4. Wpływ czasu przechowywania na morfologię plemników przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach w temperaturze 5°C.

MOR – odsetek plemników o prawidłowej morfologii; NAR – odsetek plemników z prawidłową błoną akrosomalną; HD – wady główki; MD – wady wstawki; TD – wady witki; krople proksymalne; krople dystalne. Przedstawiono wartości jako średnie (± SEM). Różnice są istotne statystycznie przy $p \leq 0{,}05$.

Źródło: P2.

Na Rysunku 5 zostały przedstawione zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych i poziomu peroksydacji lipidów plemników przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach przez okres 6 dni. Z upływem czasu przechowywania wykazano istotne zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), które zależne były od wariantu przechowywania. Dla stanu płynnego najwyższe wartości aktywności SOD stwierdzono w D2 i D4, zaś dla przechowywania w najądrzach w D0, a następnie obserwowano jej spadek z czasem przechowywania. Istotne różnice ($p \leq 0,05$) w analizie SOD wykazano pomiędzy D0 i D6 dla obu wariantów. W analizie aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) i zawartości dialdehydu malonowego (MDA) w plemnikach dla stanu płynnego wykazano najwyższe wartości w czwartym dniu przechowywania, zaś najniższe w D6. Istotne różnice ($p \leq 0,05$) dla obu zmiennych stwierdzono pomiędzy D0 a D4 dla przechowywania w stanie płynnym. Z kolei dla przechowywania w najądrzach najwyższe wartości aktywności GPx i zawartości MDA wykazano w D2, zaś najniższe w D6. Istotne różnice ($p \leq 0,05$) dla tego wariantu stwierdzono tylko w analizie zawartości MDA pomiędzy D0 oraz D2 a D6. Najniższą aktywność katalazy (CAT) dla obu wariantów stwierdzono w D4, a istotne różnice ($p \leq 0,05$) wykazano tylko pomiędzy D0 a D4.



Rysunek 5. Wpływ czasu przechowywania na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i peroksydację lipidów w plemnikach przechowywanych w stanie ciekłym i w najądrzach w temperaturze 5°C.

Aktywność SOD – aktywność dysmutazy ponadtlenkowej; aktywność GPx – aktywność peroksydazy glutationowej; zawartość MDA – zawartość dialdehydu malonowego; aktywność CAT – aktywność katalazy. Przedstawiono wartości jako średnie (± SEM). Różnice są istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$. Źródło: P2.

2. Wpływ wariantu przechowywania na ruchliwość, żywotność, morfologię i status antyoksydacyjny plemników

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że wariant przechowywania miał istotny wpływ na analizowane zmienne w zależności od czasu przechowywania (Tabela 4). Najwcześniej istotne różnice pomiędzy wariantami przechowywania wykazano w D2 i dotyczyły one odsetka plemników o prawidłowej morfologii (MOR), co wynikało ze wzrostu uszkodzeń witki dla przechowywania w najądrzach (wariant II) w porównaniu ze stanem płynnym (wariant I). W czwartym dniu przechowywania w najądrzach w porównaniu ze stanem płynnym stwierdzono istotny ($p \leq 0,05$) spadek wartości PMOT, odsetka plemników żywych, odsetka plemników z kroplami dystalnymi, aktywności SOD i GPx oraz obniżenie zawartości MDA, zaś wzrost ($p \leq 0,05$) odnotowano dla odsetka plemników z kroplami proksymalnymi. W ostatnim dniu przechowywania (D6) dla wariantu II wykazano dalszy istotny ($p \leq 0,05$) spadek wartości PMOT, odsetka plemników żywych, odsetka plemników z kroplami dystalnymi, aktywności SOD, a ponadto obniżenie wartości TMOT oraz wzrost odsetka plemników z uszkodzeniami główki w porównaniu z wariantem I.

Tabela 4. Wpływ wariantu przechowywania (stan płynny vs. przechowywanie w najądrzach) na ruchliwość, żywotność, morfologię i status antyoksydacyjny plemników jelenia szlachetnego europejskiego przechowywanych w temperaturze 5°C.

Sperm Quality Parameters	Day of Storage					
	D2 n = 11		D4 n = 11		D6 n = 10	
	Variant I	Variant II	Variant I	Variant II	Variant I	Variant II
TMOT	80.00 ± 3.16	73.17 ± 4.11	78.14 ± 2.66	68.00 ± 3.66	73.00 ± 2.26 [a]	31.00 ± 5.37 [b]
PMOT	27.40 ± 2.79	21.92 ± 1.86	26.00 ± 2.90 [a]	17.17 ± 1.77 [b]	23.58 ± 1.59 [a]	6.30 ± 1.48 [b]
Viability	87.80 ± 22.23	77.56 ± 3.26	84.02 ± 1.27 [a]	76.05 ± 2.37 [b]	74.61 ± 2.84 [a]	44.69 ± 6.22 [b]
MOR	75.74 ± 0.88[a]	56.47 ± 2.86[b]	52.35 ± 0.89	52.27 ± 3.34	51.08 ± 3.58	42.85 ± 2.84
NAR	90.94 ± 2.83	88.21 ± 1.86	96.73 ± 1.56	94.54 ± 1.48	93.93 ± 1.51	89.75 ± 2.09
HD	8.08 ± 2.58	5.47 ± 1.35	42.97 ± 1.98	3.92 ± 0.42	7.85 ± 0.88 [a]	14.63 ± 3.23 [b]
MD	2.18 ± 0.55	1.30 ± 0.29	1.98 ± 0.45	1.69 ± 0.46	2.48 ± 0.45	3.04 ± 0.74
TD	7.48 ± 1.65 [a]	28.99 ± 5.03[b]	42.97 ± 1.98	73.60 ± 33.94	38.89 ± 4.62	33.80 ± 3.63
Prox Drop	22.41 ± 6.21	13.87 ± 3.40	2.55 ± 0.45 [a]	6.78 ± 1.04 [b]	6.11 ± 2.85	9.73 ± 3.09

Dist Drop	30.22 ± 6.91	18.05 ± 2.28	51.75 ± 10.03[a]	13.65 ± 3.39[b]	45.22 ± 4.32[a]	19.28 ± 2.55[b]
SOD activity	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01[a]	0.02 ± 0.01[b]	0.02 ± 0.01[a]	0.01 ± 0.01[b]
GPx activity	28.32 ± 3.75	33.88 ± 2.07	38.90 ± 3.54[a]	27.17 ± 2.78[b]	24.75 ± 2.80	26.85 ± 3.12
MDA content	3.02 ± 1.35	4.50 ± 2.28	4.43 ± 1.14[a]	1.32 ± 0.40[b]	1.79 ± 0.50	0.67 ± 0.37
CAT activity	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01

TMOT, odsetek plemników wykazujących ruch (%); PMOT, odsetek plemników wykazujących ruch postępowy (%); Viability, odsetek plemników żywych (%); MOR, odsetek plemników o prawidłowej morfologii (%); NAR, odsetek plemników z prawidłową błoną akrosomalną (%); HD, odsetek plemników z wadą główki (%); MD, odsetek plemników z wadą wstawki (%); TD, odsetek plemników z wadą witki (%); Prox Drop, odsetek plemników z kroplą proksymalną (%); Dist Drop, odsetek plemników z kroplą dystalną (%); aktywność SOD, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (U/10^6 plemników); aktywność GPx, aktywność peroksydazy glutationowej (U/10^6 plemników); zawartość MDA, zawartość dialdehydu malonowego (µm MDA/10^6 plemników); aktywność CAT, aktywność katalazy (U/10^6 plemników). Przedstawiono wartości jako średnie (±SEM). Wartości oznaczone literami (^{a,b}) oznaczają istotne różnice statystyczne między wariantami przechowywania w tym samym dniu przechowywania przy $p \leq 0,05$. Źródło: P2.

Publikacja 3 (P3): Neuman, N. M., Gilun, P., Koziorowska-Gilun, M., Janiszewski, P., Dziekońska, A. (2025). Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the reproductive tissues of male European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). *International Journal of Molecular Sciences*, *26*, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221

Analiza ANOVA wykazała, że sezon rozrodczy (w trakcie sezonu rozrodczego oraz poza sezonem rozrodczym) i tkanka (jądro oraz głowa, trzon i ogon najądrza) oraz interakcja tych dwóch czynników istotnie ($p \leq 0,05$) wpływały na wszystkie badane aktywności enzymów antyoksydacyjnych SOD, GPx i CAT (Tabela 5).

Tabela 5. Wpływ sezonu oraz rodzaju tkanki na aktywność enzymów w analizie wariancji ANOVA.

Enzyme activity	**Season**		**Tissue**		**Season × Tissue**	
	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**
SOD activity	19.968	< 0.001	10.323	< 0.001	7.780	< 0.001
GPx activity	7.437	0.007	7.868	< 0.001	4.285	0.006
CAT activity	7.803	0.006	5.940	< 0.001	3.160	0.026

Różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0,05$; n.s., różnice nieistotne statystycznie; Aktywność SOD – aktywność dysmutazy ponadtlenkowej; Aktywność GPx – aktywność peroksydazy glutationowej; Aktywność CAT – aktywność katalazy. Źródło: P3.

Sezon, w którym zostały pobrane tkanki do badań wpłynął istotnie ($p \leq 0{,}05$) na ekspresję genu SOD3, GPx4, GPx5 oraz CAT (Tabela 6). Rodzaj tkanki wpłynął wysoko istotnie ($p < 0{,}001$) na ekspresję każdego badanego genu. Natomiast interakcja sezonu i tkanki wpłynęła istotnie na wszystkie analizowane ekspresje genów z wyjątkiem ekspresji genu SOD3.

Tabela 6. Wpływ sezonu oraz rodzaju tkanki na ekspresję genów w analizie wariancji ANOVA.

Gene Expression	Season		Tissue		Season × Tissue	
	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**
SOD1 expression	0.610	n.s.	11.576	< 0.001	3.330	0.020
SOD2 expression	1.280	n.s.	137.558	< 0.001	4.700	0.003
SOD3 expression	16.495	< 0.001	12.885	< 0.001	2.455	n.s.
GPx4 expression	6.442	0.012	254.887	< 0.001	2.712	0.045
GPx5 expression	34.054	< 0.001	100.495	< 0.001	6.300	< 0.001
CAT expression	5.639	0.018	53.686	< 0.001	12.883	< 0.001

Różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0{,}05$; n.s., różnice nieistotne statystycznie; Ekspresja SOD1 – względna ilość mRNA dysmutazy ponadtlenkowej miedź/cynk; Ekspresja SOD2 – względna ilość mRNA dysmutazy ponadtlenkowej manganowej; Ekspresja SOD3 – względna ilość mRNA pozakomórkowej dysmutazy ponadtlenkowej; Ekspresja GPx4 – względna ilość mRNA peroksydazy glutationowej 4; Ekspresja GPx5 – względna ilość mRNA peroksydazy glutationowej 5; Ekspresja CAT – względna ilość mRNA katalazy. Źródło: P3.

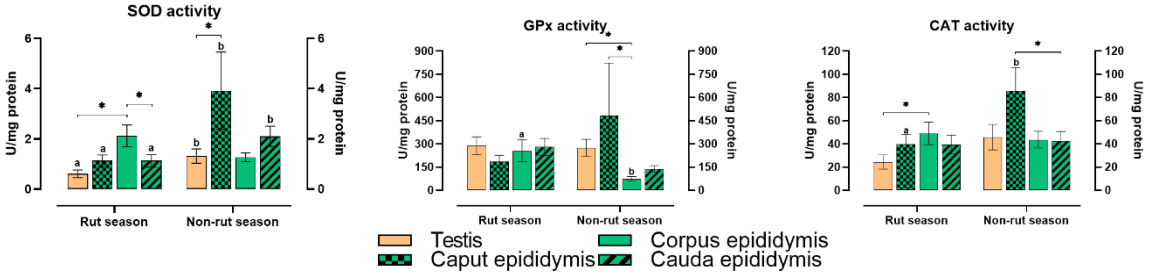
1. Aktywność eznymów antyoksydacyjnych

Czas pobrania prób (sezon rozrodczy oraz poza sezonem rozrodczym) oraz rodzaj tkanki miały istotny wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (Rys. 6). Istotnie ($p \leq 0.05$) wyższą aktywność SOD zaobserwowano w tkankach pobranych z jądra oraz głowy i ogona najądrza poza sezonem rozrodczym w porównaniu z sezonem rozrodczym. Zaobserwowano także istotnie wyższą aktywność SOD w tkance trzonu najądrza w porównaniu z tkanką jądra oraz ogona najądrza w trakcie sezonu rozrodczego. Natomiast w okresie poza sezonem rozrodczym odnotowano istotnie wyższą aktywność tego enzymu w tkance głowy najądrza w porównaniu z tkanką jądra.

W analizie aktywności GPx istotną różnicę pomiędzy sezonami wykazano tylko dla trzonu najądrza, która była statystycznie wyższa w sezonie rozrodczym. Najwyższą aktywność GPx odnotowano jednak poza sezonem dla głowy najądrza. Istotne różnice w aktywności GPx

poza sezonem rozrodczym zaobserwowano pomiędzy trzonem najądrza a jądrem i głową najądrza.

Wpływ sezonu został odnotowany w aktywności CAT tylko w odniesieniu do głowy najądrza. Aktywność CAT była istotnie wyższa dla tej tkanki poza sezonem rozrodczym w porównaniu do sezonu rozrodczego. Dla sezonu rozrodczego istotnie wyższą aktywność CAT odnotowano dla trzonu najądrza w porównaniu z jądrem. Natomiast poza sezonem rozrodczym istotnie wyższą aktywność tego enzymu wykazano dla głowy najądrza w porównaniu z ogonem najądrza.



Rysunek 6. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach układu rozrodczego jelenia europejskiego podczas sezonu rozrodczego oraz poza sezonem rozrodczym. SOD activity – aktywność dysmutazy ponadtlenkowej; GPx activity – aktywność peroksydazy glutationowej; CAT activity – aktywność katalazy. Źródło: P3.

2. Względna ilość mRNA wybranych genów

Pomiędzy sezonami we względnej ilości mRNA genu SOD1 nie wykazano statystycznie istotnych różnic niezależnie od badanej tkanki. Niezależnie od sezonu względna ilość mRNA genu SOD1 była istotnie ($p \leq 0,05$) wyższa w tkance trzonu najądrza w porównaniu z tkanką ogona najądrza (Rys. 7). Poza sezonem rozrodczym zaobserwowano istotnie wyższą względną ilość mRNA SOD1 w tkance jądra w porównaniu z tkanką głowy i ogona najądrza.

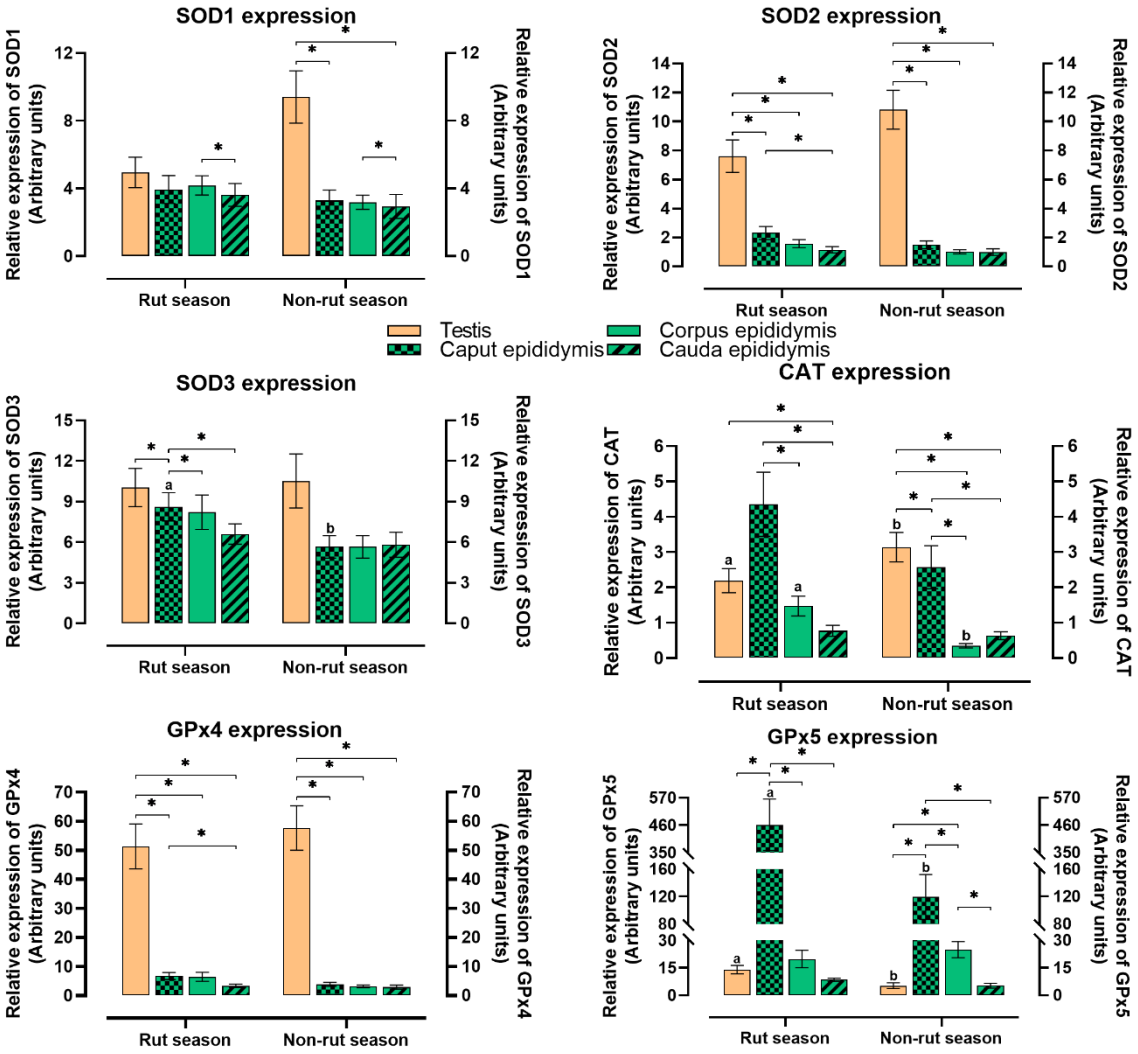
Niezależnie od sezonu odnotowano istotnie ($p \leq 0,05$) wyższą względną ilość mRNA genu SOD2 w tkance jądra w porównaniu z tkankami najądrza (głowy, trzonu i ogona). Ponadto w trakcie sezonu rozrodczego zaobserwowano istotnie wyższą względną ilość mRNA SOD2 w tkance głowy najądrza w porównaniu z ogonem najądrza.

Wpływ sezonu na względną ilość mRNA genu SOD3 odnotowano tylko w odniesieniu do tkanki głowy najądrza. Istotnie ($p \leq 0,05$) wyższą względną ilość mRNA genu SOD3 dla tej tkanki zaobserwowano dla sezonu rozrodczego w porównaniu z okresem poza sezonem rozrodczym. W obu sezonach najwyższą względną ilość mRNA SOD3 stwierdzono dla jądra, a istotne różnice pomiędzy tkankami w sezonie rozrodczym stwierdzono pomiędzy jądrem a głową najądrza oraz pomiędzy głową najądrza a trzonem i ogonem najądrza.

Istotne różnice pomiędzy sezonami we względnej ilości mRNA genu CAT wykazano dla jądra i trzonu najądrza. W sezonie rozrodczym wykazano istotnie ($p \leq 0,05$) niższą względną ilość mRNA genu CAT dla jądra, a wyższą dla trzonu najądrza w porównaniu do okresu poza sezonem rozrodczym. Niezależnie od sezonu zaobserwowano istotnie wyższą względną ilość mRNA CAT w głowie najądrza w porównaniu z trzonem i ogonem najądrza oraz istotnie wyższą w jądrze w porównaniu z ogonem najądrza. W okresie poza sezonem rozrodczym wykazano istotnie wyższą względną ilość mRNA tego genu dla jądra w porównaniu z głową najądrza.

Niezależnie od sezonu istotnie ($p \leq 0,05$) wyższą względną ilość mRNA genu GPx4 stwierdzono w jądrze w porównaniu do tkanek najądrza. W sezonie rozrodczym istotnie wyższą względną ilość mRNA genu GPx4 wykazano dla głowy najądrza w porównaniu do ogona najądrza.

Istotny wpływ sezonu na względną ilość mRNA genu GPx5 wykazano dla jądra i głowy najądrza. W sezonie rozrodczym dla tych tkanek stwierdzono istotnie ($p \leq 0,05$) wyższą względną ilość mRNA genu GPx5 dla sezonu rozrodczego w porównaniu z okresem poza sezonem rozrodczym. Niezależnie od sezonu rozrodczego wykazano istotnie najwyższą względną ilość mRNA GPx5 dla głowy najądrza. W okresie poza sezonem rozrodczym stwierdzono istotnie wyższą względną ilość mRNA dla trzonu najądrza w porównaniu z jądrem oraz ogonem najądrza.

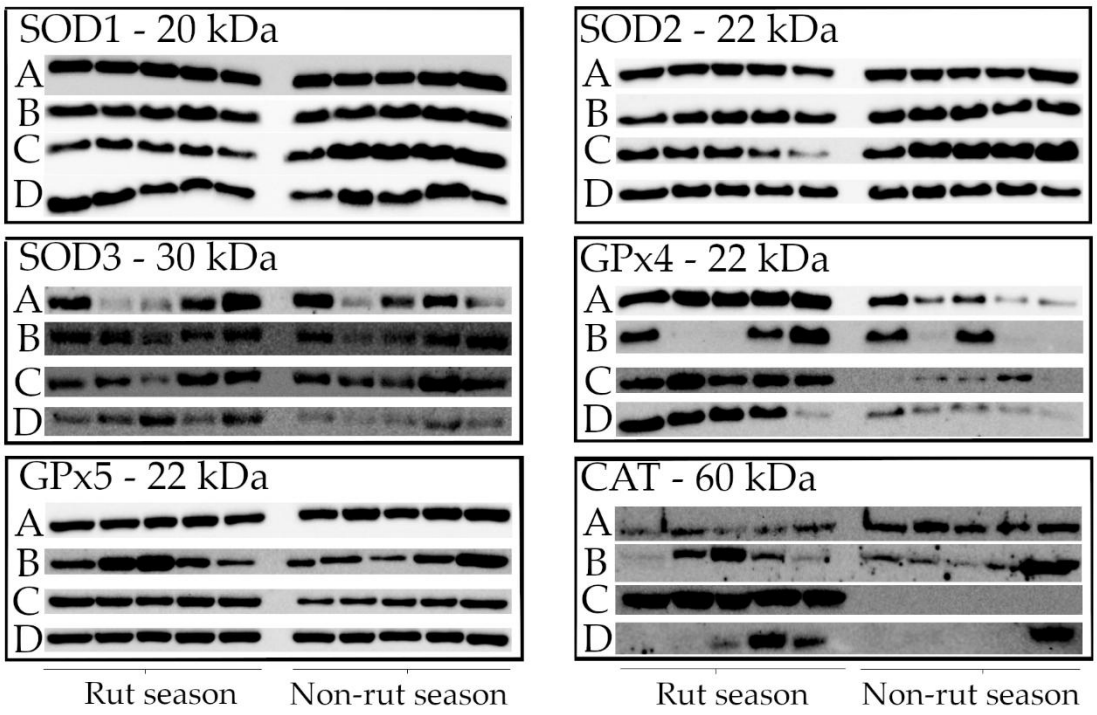


Rysunek 7. Względna ilość mRNA dla analizowanych genów w tkankach rozrodczych jelenia europejskiego w sezonie rozrodczym i poza nim. Ekspresja SOD1 – względna ilość mRNA dla cytoplazmatycznej miedziowo/cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej; Ekspresja SOD2 – względna ilość mRNA dla manganowej dysmutazy ponadtlenkowej; Ekspresja SOD3 – względna ilość mRNA dla pozakomórkowej SOD; Ekspresja GPx4 – względna ilość mRNA dla peroksydazy glutationowej 4; Ekspresja GPx5 – względna ilość mRNA dla peroksydazy glutationowej 5; Ekspresja CAT – względna ilość mRNA dla katalazy. Przedstawiono wartości względnej ilości mRNA jako średnie (± SEM). a, b różnice istotne statystycznie przy $p \leq 0{,}05$ między sezonami. Wartości oznaczone * różnią się istotnie statystycznie przy $p \leq 0{,}05$ między analizowanymi tkankami w obrębie każdego sezonu. Źródło: P3.

3. Analiza Western blot

Analiza białek metodą Western blot została przeprowadzona na losowo wybranych osobnikach biorąc pod uwagę równą liczbę osobników w grupie (sezon rozrodczy n = 5, poza sezonem rozrodczym n = 5) (Rys. 8). Na każdy żel nanoszono próby w takiej samej kolejności pochodzące z danej tkanki. Wszystkie analizowane białka zostały zidentyfikowane. Białka

SOD1, SOD2 i SOD3 zostały wykryte u wszystkich osobników, co zgadza się z wynikami uzyskanymi z analizy ekspresji mRNA oraz aktywności enzymów. Dane dotyczące białka GPx4 i GPx5 oraz CAT również pokrywają się z danymi uzyskanymi podczas ekspresji genów tych białek.



Rysunek 8. Analiza Western blot dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1), dysmutazy ponadtlenkowej 2 (SOD2), dysmutazy ponadtlenkowej 3 (SOD3), peroksydazy glutationowej 4 (GPx4), peroksydazy glutationowej 5 (GPx5) i katalazy (CAT) w jądrze (A), głowie najądrza (B), trzonie najądrza (C) i ogonie najądrza (D) w sezonie rozrodczym (rut season, n = 5) i poza sezonem rozrodczym (non-rut season, n = 5). Źródło: P3.

7. Dyskusja

Plemniki przechowywane w najądrzach, pobrane pośmiertnie od odstrzelonych zwierząt, mogą przyczynić się do zachowania materiału genetycznego pochodzącego od osobników o wyjątkowych cechach oraz lepszej ochrony gatunkowej zwierząt, w tym jeleniowatych. Na małych fermach jeleniowatych o ograniczonej populacji osobników, gdzie przewagę najczęściej stanowi jeleń europejski (Bombik i Kondracki, 2007), często istnieje problem chowu wsobnego. Stąd też możliwość wykorzystanie plemników od wolno żyjących jeleni europejskich do reprodukcji może przyczynić się do znacznego ograniczenia inbredu.

We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na jeleniach iberyjskich, wykazano, że integralność błon plemników przechowywanych w najądrzach i w stanie płynnym przez 192 godziny była zachowana na podobnym poziomie przez cały okres przechowywania, a jedynie ruchliwość obniżyła się do poziomu poniżej 40% (Fernández-Santos i in., 2009). Podobne obserwacje wykazał Soler i in. (2005) podczas przechowywania plemników przez 96 godzin, a ruchliwość plemników utrzymywała się na poziomie około 55%. W przypadku jelenia europejskiego wykazano, że plemniki najądrzowe mogą być przechowywane w stanie płynnym przez znacznie dłuższy czas (Dziekońska i in., 2020, 2022b), ale właściwości biologiczne plemników przechowywanych w najądrzach nie zostały dotychczas zbadane.

Według dotychczasowej wiedzy, badania mające na celu zbadanie wpływu sezonu rozrodczego na status antyoksydacyjny wybranych tkanek układu rozrodczego samców jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*) są pierwszymi. Wcześniejsze badania odnosiły się do innych zwierząt, m.in. saren, żubrów, koni oraz mieszańców dzika i świni domowej (Dziekońska i in., 2014; Koziorowska-Gilun i in., 2013, 2015, 2018). Jednak najdokładniej został zbadany status antyoksydacyjny ludzkich tkanek rozrodczych (Nonogaki i in., 1992; Taylor, 2001; Williams i in., 1998b).

Aby wypełnić tę lukę w wiedzy, przeprowadzono niniejsze badanie porównujące właściwości biologiczne plemników jelenia europejskiego przechowywanych w najądrzach i w stanie płynnym oraz status antyoksydacyjny tkanek układu rozrodczego. **W publikacji 1. (P1)** w obu wariantach plemniki przechowywano w temperaturze 5°C przez 144 godziny. Powyższa temperatura jest zalecana do konserwacji plemników przeżuwaczy, w tym jeleniowatych (Asher i in., 2000; Fernández-Santos i in., 2006; Soler i in., 2003, 2005).

W badaniach analizowano parametry ruchliwości i ruchu plemników, integralność błon plazmatycznych i akrosomalnych, aktywności mitochondriów, integralność DNA oraz zmiany

apoptotyczne w różnych godzinach przechowywania plemników. Badane parametry określają przydatność plemników do technologii wspomaganego rozrodu (Mocé i Graham, 2008).

Ocena ruchliwość i parametrów ruchu plemników jest kluczowym kryterium oceny jakości i przydatności plemników w celach technologicznych (Dott i Foster, 1979; Malo i in., 2005; Martínez i in., 2006). Dlatego jest ona podstawową analizą do określenia ich przydatności dla technik wspomaganego rozrodu zwierząt (ART). Analiza odsetka plemników o ruchu postępowym i parametrów ruchu wykazała, że plemniki przechowywane w stanie płynnym w porównaniu do przechowywanych w najądrzach, zachowywały istotnie wyższe wartości wszystkich analizowanych parametrów (VAP, VSL, VCL, STR, LIN) od 48 godziny przechowywania. To też wskazuje, że przechowywanie w najądrzach powoduje znacznie wcześniej zaburzenia w ruchu plemników niż przechowywanie w stanie płynnym. Wyniki niniejszego badania mogą sugerować, że plemniki przechowywane w stanie płynnym są lepiej przystosowane do celów technologicznych. Niemniej jednak uzyskane wyniki dotyczące ruchliwości sugerują, że plemniki przechowywane w najądrzach przez okres do 96 godzin mogą być również wykorzystywane do celów reprodukcyjnych. Ta metoda przechowywania może stanowić realne rozwiązanie w zakresie przechowywania cennego materiału genetycznego od wolno żyjących jeleniowatych, gdy próbki nie mogą być szybko dostarczone do laboratorium. Różnice w ruchliwości plemników obserwowane w różnych wariantach przechowywania były też uwarunkowane rozcieńczalnikiem, co mogło być związane z ich składem. W składzie rozcieńczalnika Bovidyl® oprócz tych samych składników, które są obecne w rozcieńczalniku Salomon (tj. cytrynian, TRIS, żółtko jaja kurzego), dodatkowo występuje również albumina bydlęca i antyoksydanty. Związki te działają ochronnie na błony plazmatyczne i akrosomalne (Castellini i in., 2021; Plante i in., 2016), co może pozytywnie wpłynąć na ruchliwość plemników (Akhter i in., 2014; Tsutsui i in., 2003). Żółtko jaja obecne w obu rozcieńczalnikach, ze względu na swoje właściwości biochemiczne, pomaga chronić błony komórkowe oraz akrosomalne plemników przed uszkodzeniami spowodowanymi udarem chłodowym (Fernández-Santos i in., 2006). W komputerowej analizie ruchu plemników obserwowano wysokie wartości VCL i ALH, a obniżenie wartości LIN i STR, co wskazywało na hiperaktywację plemników, których ruch był podobny do tego stosowanego w modelu hiperaktywacji (Suarez i Ho, 2003). Według Suarez i Ho (2003) podczas hiperaktywacji plemników zmienia się praca witki, co doprowadza do ruchu plemników o dużej amplitudzie i niskiej liniowości. Zjawisko to może być związane z napływem wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub wzrostem pH wewnątrzkomórkowego podczas

kapacytacji plemników (Hinrichs i Loux, 2012). Zastosowanie odpowiedniego rozcieńczalnika z dodatkiem TRIS mogło też przyczynić się do wzrostu wartości ALH (Yániz i in., 2010).

Funkcjonalność mitochondriów i nienaruszony potencjał błony mitochondrialnej są niezbędne do utrzymania przede wszystkim ruchu postępowego (Del Prete i in., 2022; Volpe i in., 2009), hiperaktywacji, kapacytacji, aktywności akrozyny, reakcji akrosomowej i integralności DNA (Barbagallo i in., 2020; Durairajanayagam i in., 2021; Herst i in., 2017; Marchetti i in., 2004). W niniejszych badaniach stwierdzono, że z czasem przechowywania obniżeniu aktywności mitochondriów towarzyszyły również zmiany w ruchliwości przechowywanych plemników oraz integralności błon plazmatycznych i akrosomalnych. Ponadto spadek aktywności mitochondriów podczas przechowywania był związany również ze wzrostem odsetka plemników żywych ze zmianami apoptotycznymi oraz odsetka plemników martwych, co obserwowano również we wcześniejszych badaniach (Dziekońska i in., 2022b; Martínez-Pastor i in., 2008; Trzcińska i in., 2011). Przyczyną wzrostu zmian apoptotycznych są zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów, podczas których dochodzi do nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RFT), utraty potencjału błonowego mitochondriów, aktywacji kaspaz, ekspozycji na fosfatydyloserynę oraz uszkodzenia DNA (Aitken i in., 2016; Castellini i in., 2021; Shukla i in., 2012). Zmiany te mogą być odpowiedzialne za postępujący spadek właściwości biologicznych przechowywanych plemników. Wyniki analiz korelacji przeprowadzonych w tych badaniach potwierdziły, że funkcjonalność analizowanych struktur plemników przechowywanych zarówno w stanie płynnym, jak i najądrzach jest istotnie ze sobą skorelowana, a także z ruchliwością plemników.

Zachowanie integralności błon akrosomalnych plemników jest niezbędne do utrzymania funkcji plemników, w tym ich zdolności do ruchu (Love, 2011). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dotyczące ruchliwości plemników najądrzowych przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach były zgodne z prezentowanymi we wcześniejszych doniesieniach (Dziekońska i in., 2022a, 2022b; Martínez-Pastor i in., 2005a; Soler i in., 2005). Plemniki najądrzowe przechowywane w stanie płynnym zachowywały do 6 dnia przechowywania satysfakcjonującą ruchliwość i żywotność (powyżej 70%), co może wskazywać na zachowanie ich funkcjonalności. Odkrycie to potwierdza wyniki naszych poprzednich badań, które wykazały, że plemniki najądrzowe przechowywane w stanie płynnym przez okres do 10 dni pozostają przydatne do celów rozrodczych (Dziekońska i in., 2022a). Przechowywanie w najądrzach utrzymywało ruchliwość i żywotność na poziomie porównywalnym do stanu płynnego tylko do 2 dnia przechowywania. Ruchliwość i żywotność są ściśle ze sobą skorelowane (Dziekońska

i in., 2020), co zostało potwierdzone w niniejszych badaniach niezależnie od zastosowanej metody przechowywania (materiały dodatkowe: Tables S1 i S2, Figure S1).

Integralność DNA może wpływać na zdolność plemników do zapłodnienia, dlatego analiza ta jest często zalecana w celu oceny jakości plemników i ich przydatności do reprodukcji. Uszkodzenia chromatyny w plemnikach mają negatywny wpływ na rozwój zarodka i płodu (Larson-Cook i in., 2003; Sadeghi i in., 2009). W niniejszym badaniu nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku plemników z nienaruszonym DNA, niezależnie od wariantu i czasu przechowywania, z wyjątkiem prób plemnikowych przechowywanych w rozcieńczalniku Salomon przez 96 godzin. Uzyskane wyniki sugerują, że struktura DNA pozostaje dość stabilna do 144 godzin w plemnikach przechowywanych w najądrzach i w stanie płynnym. Podobne obserwacje odnotowano w poprzednich badaniach (Dziekońska i in., 2022a, b; Soler i in., 2005). Niemniej jednak są doniesienia, które wskazywały znaczny spadek liczby plemników z nienaruszonym DNA, w szczególności w plemnikach przechowywanych w najądrzach (Fernández-Santos i in., 2009). Na uzyskane wyniki mogą mieć wpływać różne czynniki, w tym czułość zastosowanej metody laboratoryjnej (Dziekońska i in., 2023; Muratori i in., 2008). Obecnie do analizy stopnia uszkodzenia DNA stosuje się różne metody. Należą do nich test kometowy, test struktury chromatyny plemników (SCSA), test dyspersji chromatyny plemników (SCDt) lub test terminalnej deoksyrybonukleotydylotransferazy dUTP (TUNEL), a te testy są bardziej zalecane niż test z oranżem akrydyny (AO) (Maside i in., 2023; Shamsi i in., 2011). W przeciwieństwie do innych metod, test AO zapewnia jedynie przybliżony obraz uszkodzeń DNA, dlatego może nie wykryć istotnych różnic pomiędzy wariantami przechowywania.

W niniejszym badaniu różnice we właściwościach biologicznych plemników jelenia europejskiego przechowywane w najądrzach i w stanie płynnym zaobserwowano znacznie wcześniej niż w badaniu plemników jelenia iberyjskiego (Fernández-Santos i in., 2009). W tym badaniu najądrza były przechowywane w worku mosznowym przez cały czas trwania eksperymentu, podczas gdy we wspomnianym badaniu najądrza były wypreparowane i umieszczone w foliowych workach przechowywanych w pojemnikach wypełnionych wodą. Można zatem przypuszczać, że zastosowany sposób przechowywania najądrzy mógł również wpłynąć na wcześniejszy spadek właściwości biologicznych plemników przechowywanych w najądrzach w porównaniu do stanu płynnego, ale konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia tej obserwacji. Niemniej jednak, uzyskane wyniki wskazują, że plemniki jelenia

europejskiego przechowywane w najądrzach w temperaturze 5°C przez okres do 96 godzin mogą być potencjalnie wykorzystane do celów reprodukcyjnych.

W publikacji 2. (P2) po raz pierwszy zaprezentowano badania dotyczące wpływu czasu na zmiany morfologiczne i status antyoksydacyjny plemników najądrzowych jelenia europejskiego przechowywanych w najądrzach i w stanie płynnym. Wcześniejsze doniesienia dotyczyły innych gatunków zwierząt (Kankofer i in., 2005; Nair i in., 2006; Perumal, 2014; Wysokińska i in., 2023), a te dotyczące jeleniowatych są ograniczone do kilku doniesień dotyczących zmian morfologicznych (Hishinuma i in., 2003; Soler i in., 2003).

Przechowywanie komórek plemnikowych niezależnie od zastosowanej metody prowadzi do wielu zmian starzeniowych, które prowadzą do zaburzenia procesów metabolicznych, wzrostu procesu peroksydacji lipidów, co skutkuje uszkodzeniami różnych struktur plemników (Conejo-Nava i in., 2003; Neild i in., 2005; Partyka i in., 2012; Wysokińska i in., 2023). W publikacji 2. z czasem przechowywania zaobserwowano spadek odsetka plemników o prawidłowej morfologii, który zależny był od zastosowanego wariantu przechowywania. Przechowywanie w najądrzach w porównaniu do stanu płynnego skutkowało istotnym wzrostem odsetka plemników z wadami witki, a w późniejszym czasie (D6) także odsetka plemników z wadami wstawki i główki. Zmiany te mogły wpłynąć na pogorszenie ruchliwości i żywotności plemników (Love, 2011), co obserwowano dla najądrzy w 2 dniu przechowywania, podczas gdy dla przechowywania w stanie płynnym istotne zmiany obserwowano od D4. Interesujące jest, że przechowywanie w najądrzach w porównaniu do stanu płynnego korzystnie wpłynęło na obniżenie odsetka plemników z kroplami cytoplazmatycznymi (zwłaszcza dystalnymi). Obecność kropli cytoplazmatycznych jest charakterystyczna dla niedojrzałych plemników i powszechna dla plemników pozyskanych z najądrzy (Cooper i in., 2004; Ros-Santaella i in., 2014; Xu i in., 2013). Podczas dojrzewania plemniki tracą krople cytoplazmatyczne. Otrzymane wyniki wskazują zatem, że przechowywanie w najądrzach przyczyniło się do kontynuacji procesu ich dojrzewania. Obniżenie odsetka plemników z kroplami cytoplazmatycznymi podczas przechowywania w stanie płynnym korelowało ze zmianami ruchliwości, co wcześniej wykazano dla najądrzowych plemników myszy (Yuan i in., 2013) i wskazywałoby też na istotną rolę kropli cytoplazmatycznych w regulacji ich ruchliwości (Ros-Santaella i in., 2014). We wcześniejszych doniesieniach wykazano, że krople cytoplazmatyczne są przejściowymi organellami, które służą jako źródło energii niezbędnej do dojrzewania plemników najądrza (Kozioł i Koziorowski, 2015; Yuan i in., 2013).

Nieodwracalne uszkodzenia różnych struktur plemników powstają na skutek zaburzeń procesów metabolicznych w plemnikach, m.in. utleniania lipidów (Partyka i in., 2012). Podczas procesu przechowywania dochodzi do wzrostu uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych wolnymi rodnikami tlenowymi (RFT). RFT powstają w mitochondriach i błonach plazmatycznych plemników, a ich ilość jest kontrolowana przez system antyoksydacyjny złożony z enzymatycznych i nieenzymatycznych przeciwutleniaczy (Agarwal i in., 2003; Marchlewicz i in., 2016). System enzymatyczny u licznych gatunków zwierząt składa się głównie z GPx, CAT oraz SOD (Koziorowska-Gilun i in., 2011; Marchlewicz i in., 2016; Partyka i in., 2012). Spośród nich SOD uważana jest za główny enzym w systemie obrony antyoksydacyjnej plemników (Alvarez i in., 1987; Bartosz, 2013).

W niniejszych badaniach aktywność SOD w plemnikach przechowywanych w stanie płynnym obniżała się wraz z czasem przechowywania, co też zgadzało się z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi plemników tryków przechowywanych w stanie płynnym (Hashem i in., 2017), a także plemników buhajów i bawołów (Nair i in., 2006). W odniesieniu do przechowywania w najądrzach również wykazano spadek aktywności SOD, jednak istotne zmiany obserwowano znacznie wcześniej (od 2 dnia). Ponadto plemniki najądrzowe przechowywane w stanie płynnym od 4 dnia charakteryzowały się wyższą aktywnością SOD niż przechowywane w najądrzach, co może potwierdzać ich lepsze zdolności antyoksydacyjne. Interesujące jest, że aktywność GPx plemników przechowywanych w najądrzach utrzymywała się na podobnym poziomie przez cały czas przechowywania, zaś dla stanu płynnego najwyższą aktywność GPx wykazano w 4 dniu przechowywania. Wyniki te odbiegają od wcześniejszych, ale otrzymanych dla plemników buhajów i bawołów, dla których wykazano spadek aktywności z czasem przechowywania (Nair i in., 2006).

Podczas przechowywania plemników obserwowano wzrost zawartości MDA, który wskazuje na nasilenie procesu peroksydacji lipidów. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że proces peroksydacji lipidów zachodził znacznie wcześniej w najądrzach (najwyższa zawartość MDA została stwierdzona w 2 dniu) niż w stanie płynnym (w 4 dniu). Wzrostowi zawartości MDA towarzyszył też wzrost aktywności GPx w plemnikach. Można zatem przypuszczać, że aktywność tego enzymu antyoksydacyjnego prawdopodobnie wzrosła, by przeciwdziałać wzrostowi produkcji RFT (Bayomy i in., 2023; Coyan i in., 2010; Partyka i in., 2012).

Proces peroksydacji lipidów inicjowany jest przez wolne rodniki tlenowe, których wytwarzanie jest kontrolowane przez SOD, GPX i CAT. SOD katalizuje dysmutację

anionorodnika ponadtlenkowego (O^{2-}) do O_2 i H_2O_2 (Gotowiecka i in., 2015b; Koziorowska-Gilun i in., 2011, 2016). Z kolei powstały H_2O_2 jest rozkładany przez katalazę na tlen i wodę. Ponadto H_2O_2 jest neutralizowany dzięki peroksydazie glutationowej i reduktazie glutationowej (Aitken i in., 1996; Gotowiecka i in., 2015b; Koziorowska-Gilun i in., 2011).

W tych badaniach wykazano niską aktywność CAT w plemnikach zarówno przechowywanych w najądrzach jak i stanie płynnym, co może wskazywać, że głównym enzymem odpowiedzialnym za rozkład H_2O_2 w plemnikach jelenia jest GPx. Taka obserwacja potwierdza wcześniejsze doniesienia Drevet (2006). Z czasem przechowywania, podobnie jak dla pozostały enzymów antyoksydacyjnych, wykazano spadek aktywności CAT. Uzyskane niskie wartości CAT w plemnikach mogą też wskazywać, że katalaza występuje w plemnikach jelenia tylko w ilościach śladowych. Niemniej jednak dla potwierdzenia tego stwierdzenia należałoby wykonać też dodatkowe badania z wykorzystaniem bardziej czułych testów i badań molekularnych, ponieważ CAT nie został wykryty w plemnikach wielu gatunków zwierząt, w tym bydła, psów i knurów (Bilodeau i in., 2000; Koziorowska-Gilun i in., 2011; Strzeżek i in., 2009). Kilku autorów zaobserwowało wyjątkowo niski poziom aktywności CAT w plemnikach ludzi i szczurów (Jeulin i in., 1989; Tramer i in., 1998). Obecność CAT stwierdzono zaś w plemnikach ogiera (Kankofer i in., 2005).

Dla plemników jelenia europejskiego dotychczas nie przeprowadzono badań dotyczących oceny ich statusu antyoksydacyjnego i dlatego badania te mogą dostarczyć nowych informacji, które mogą być też przydatne dla rozwoju technologii konserwacji plemników najądrzowych.

W publikacji 3. (P3) oceniono status antyoksydacyjny tkanek jąder i najądrzy jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*), który umożliwia pełniejszą ocenę ochrony tkanek, ale także plemników, które są tam produkowane i przechowywane. System antyoksydacyjny zapobiega gromadzeniu RFT w komórkach organizmu, ponieważ nadmierna produkcja RFT ma niekorzystny wpływ na komórki, co prowadzi do stresu oksydacyjnego (Gotowiecka i in., 2015a; Marchlewicz i in., 2016). Wskazuje się, że wszystkie organizmy żywe wytwarzają RFT podczas podstawowych procesów komórkowych, w tym fosforylacji oksydacyjnej w łańcuchu oddechowym (Łuszczewski i in., 2007), czy w trakcie procesu spermatogenezy i dojrzewania plemników w najądrzach (Aitken i Vernet, 1998; Marchlewicz i in., 2016). Niewielkie ilości RFT odgrywają istotną rolę w organizmie, indukując apoptozę, stymulując transport glukozy do komórek oraz uczestnicząc w hiperaktywacji i kapacytacji plemników, a także uczestniczą w reakcji akrosomalnej plemników (Gotowiecka i in., 2015a; Kankofer i in., 2005;

Łuszczewski i in., 2007; Marchlewicz i in., 2016). Z kolei stres oksydacyjny może doprowadzić do utleniania białek i uszkodzenia kwasów nukleinowych, fosfolipidów błonowych i chromosomów (Li i in., 2018; Łuszczewski i in., 2007; Perumal, 2014).

Niniejsze badania wykazały znaczne różnice w aktywności SOD w jądrach i najądrzach oraz w ekspresji mRNA trzech badanych izoform enzymu SOD, które były uwarunkowane sezonem. Ponadto niezależnie od sezonu, zaobserwowano znaczne różnice pomiędzy analizowanymi tkankami. Ekspresja mRNA SOD3 była wyższa w tkankach najądrzy w porównaniu z ekspresją mRNA SOD1 i SOD2. Natomiast ekspresja mRNA SOD2 i SOD3 była wyższa w jądrach niż w najądrzach. Wyniki te mogą świadczyć o tym, że izoformy SOD2 i SOD3 odgrywają ważniejszą rolę w ochronie antyoksydacyjnej jąder niż SOD1. Podobne obserwacje wykazano w tkankach rozrodczych samców żubra (Koziorowska-Gilun i in., 2013). Jednak wszystkie trzy izoformy SOD są niezbędne do prawidłowej ochrony przed szkodliwym działaniem RFT (Aitken i Roman, 2008). Ekspresja mRNA SOD2 w tym badaniu była najwyższa w tkance jąder niezależnie od sezonu. Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych na myszach (Jones i in., 1995). Funkcje poszczególnych izoform enzymu SOD nie zostały jeszcze w pełni poznane. Jednak do tej pory wykazano, że SOD3 chroni jądra i plemniki, które tam powstają przed peroksydacją lipidów. Peroksydacja lipidów powoduje uszkodzenia DNA plemników, utratę ich ruchliwości, ale także doprowadza do zmian w przepuszczalności błon plazmatycznych komórek, co w przypadku komórek plemnikowych doprowadza do zmniejszenia ich zdolności zapładniających (Kankofer i in., 2005; Partyka i in., 2012; Perumal, 2014). Plemniki są szczególnie narażone na peroksydację lipidów, ze względu na wysoki udział wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w ich błonach (Kankofer i in., 2005; Reglero i in., 2009). Peltola i in. (1996) wykazali, że RFT są produkowane przez komórki Leydiga i Sertoliego w jądrach. Ponadto duże ilości RFT powstają podczas procesu spermatogenezy (Mruk i in., 2002). W tym przypadku to prawdopodobnie SOD2 i SOD3 odgrywają główną rolę w reakcjach enzymatycznych, które zapobiegają nadmiernej produkcji RFT w tkankach jądra (Koziorowska-Gilun i in., 2013).

W niniejszym badaniu zaobserwowano podobne zmiany aktywności CAT i SOD w poszczególnych tkankach układu rozrodczego. Taka zależność potwierdza, że CAT rozkłada H_2O_2, który powstaje w wyniku działania SOD w komórkach (Gotowiecka i in., 2015a; Mruk i in., 2002). Niezależnie od sezonu rozrodczego, aktywność CAT była wyższa w tkankach najądrzy niż w jądrach, co może wskazywać, że najądrza są w stanie szybciej rozkładać H_2O_2, który jest wytwarzany podczas procesów dojrzewania plemników niż jądra (Koziorowska-

Gilun i in., 2015). U jelenia europejskiego ekspresja mRNA CAT była najwyższa w głowie najądrzy w trakcie sezonu rozrodczego. Podobne wyniki odnotowano u żubra i sarny (Koziorowska-Gilun i in., 2013, 2015), a także u szczurów (Zini i Schlegel, 1996). Ekspresja genu CAT była niska w tkance jądra w okresie rozrodczym, co potwierdzają wcześniejsze ustalenia Zini i Schlegel (1996), w których dowodzono, że jądro nie jest odpowiednio przystosowane do usuwania H_2O_2. W tym badaniu nie wykazano powiązań pomiędzy poziomami ekspresji mRNA CAT, a poziomami aktywności tego enzymu, co zaobserwowano również we wcześniejszych badaniach (Koziorowska-Gilun i in., 2013, 2015). Jedną z przyczyn takiej obserwacji może być mechanizm regulacji ekspresji genów. Reaktywne formy tlenu są w stanie regulować czynniki transkrypcyjne ekspresji mRNA CAT i translację tego genu (Lambertucci i in., 2007; Quan i in., 2011). Istnieje prawdopodobieństwo, że u jeleni europejskich mechanizm ten mógł mieć wpływ na regulację ekspresji mRNA CAT w jądrach i głowie najądrzy. Katalaza była prawdopodobnie głównym enzymem systemu antyoksydacyjnego w tych tkankach układu rozrodczego.

Oprócz katalazy to peroksydaza glutationowa jest w stanie rozkładać H_2O_2 w komórkach, ale sposób działania tych enzymów opiera się na innym mechanizmie (Drevet, 2006; Noblanc i in., 2012; Vernet i in., 2004). Katalaza jest aktywowana w odpowiedzi na wysokie stężenie H_2O_2. Badania wykazały, że niektóre enzymy, w tym enzymy systemu antyoksydacyjnego, mogą być aktywowane przez wybuchy oksydacyjne, które mogą występować w organizmie podczas stresu oksydacyjnego (Chabory i in., 2010; Vernet i in., 2004).

W badaniu wykazano najwyższą aktywność GPx w jądrach w okresie sezonu rozrodczego, a wyższy poziom ekspresji mRNA GPx4 wykazano dla tej tkanki w porównaniu do pozostałych tkanek, niezależnie od sezonu rozrodczego. Podobne zależności zauważyli w badaniach Vernet i in. (2004), Foresta i in. (2002) oraz Koziorowska-Gilun i in. (2013, 2015). Obserwacja ta potwierdza, że wysoka aktywność GPx może kompensować niską aktywność CAT w jądrach. W niniejszym badaniu obfitość mRNA GPx5 była znacznie niższa w jądrach niż w najądrzach, niezależnie od sezonu rozrodczego. Najwyższy poziom tego genu uzyskano w tkance głowy najądrza. Podobne wyniki odnotowano w badaniach dotyczących męskiego układu rozrodczego u szczurów, buhajów, myszy, owiec i świń (Belleannèe i in., 2011; Grignard i in., 2005; Li i in., 2018; Okamura i in., 1997; Williams i in., 1998a). Ekspresja mRNA GPx5 była niższa w ogonie najądrza niż w trzonie najądrza. Uzyskane wyniki zgadzają się ze wcześniejszymi uzyskanymi u owiec (Li i in., 2018). Peroksydaza glutationowa 5 jest charakterystycznym enzymem dla najądrzy i została zidentyfikowana w różnych odcinkach

najądrza u różnych gatunków zwierząt (Chabory i in., 2010; Drevet, 2006; Grignard i in., 2005). Według wielu badaczy sezonowe zmiany poziomu hormonów wpływają na działanie układu rozrodczego u wielu gatunków zwierząt (Gerlach i Aurich, 2000; Martínez-Pastor i in., 2005b). U jeleniowatych w okresie rui maksymalną ilość testosteronu w surowicy i osoczu nasienia, duże rozmiary i intensywną aktywność mejotyczną jąder zaobserwowali Lincoln G. (2010), Barrell i in. (1985), Roelants i in. (2002), Goeritz i in. (2003) oraz Kozioł i Koziorowski (2013). Ponadto Aitken i Roman (2008) stwierdzili, że takie zmiany sezonowe poziomu hormonów w jądrach i najądrzach mają duży wpływ na aktywność i ekspresję enzymów antyoksydacyjnych. Marchlewicz i in. (2016) oraz Belleannèe i in. (2012) zasugerowali, że androgeny pośrednio regulują ekspresję GPx5 poprzez tkankowo specyficzny czynnik transkrypcyjny. U kóz testosteron może zwiększać ekspresję GPx5 poprzez receptory androgenowe (Luan i in., 2019). W odniesieniu do jeleniowatych, u których rozród jest sezonowy, zachodzące zmiany hormonalne mogły również wpływać na ekspresję genu GPx. W przeprowadzonym badaniu wahania hormonalne mogą być również odpowiedzialne za istotnie wyższą ekspresję GPx5 w jądrach i głowie najądrzy w okresie sezonu rozrodczego w porównaniu do sezonu poza rozrodczego. Jednak w celu potwierdzenia tych obserwacji konieczne są dalsze badania obejmujące analizę poziomu hormonów.

8. Podsumowanie i wnioski

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, składające się z serii trzech powiązanych tematycznie prac, są kompleksowym opracowaniem badającym właściwości biologiczne plemników najądrzowych jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*), które były przechowywane w najądrzach i w stanie płynnym oraz analizującym status antyoksydacyjny wybranych tkanek układu rozrodczego (jądra oraz najądrza z uwzględnieniem jego trzech części: głowy, trzonu i ogona). Uzyskane wyniki badań umożliwiły weryfikację postawionych hipotez oraz sformułowanie następujących wniosków.

1. Plemniki jelenia europejskiego przechowywane w najądrzach w temperaturze 5°C przez okres do 96 godzin zachowują pełną żywotność i funkcjonalność.
2. Przechowywanie plemników w najądrzach powyżej 48 godzin w porównaniu do przechowywania w stanie płynnym prowadzi do wyraźnego pogorszenia parametrów kinetycznych ruchu.
3. Przechowywanie plemników w najądrzach skutkuje przyspieszeniem procesu peroksydacji lipidów, wzrostem liczby defektów morfologicznych oraz spadkiem aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Zmiany te stanowią główną przyczynę obniżenia żywotności i ruchliwości plemników przechowywanych w najądrzach w porównaniu do tych przechowywanych w stanie płynnym.
4. Przechowywanie w stanie płynnym w porównaniu do przechowywania w najądrzach korzystniej wpływa na właściwości biologiczne najądrzowych plemników i dlatego ta metoda, jeśli jest to możliwe, powinna być bardziej zalecana do krótkoterminowego ich przechowywania.
5. Zastosowanie odpowiedniego rozcieńczalnika może przyczynić do poprawy właściwości biologicznych najądrzowych plemników przechowywanych w stanie płynnym. W badaniach wykazano, że rozcieńczalnik Bovidyl® lepiej zabezpieczał ruchliwość i integralność błon przechowywanych plemników niż rozcieńczalnik Salomon.
6. Procesy fizjologiczne zachodzące w układzie rozrodczym samców jelenia europejskiego podlegają silnej zmienności sezonowej. Znajduje to odzwierciedlenie w zróżnicowanej ekspresji mRNA oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD, GPx, CAT) w tkankach jąder i najądrzy pomiędzy okresem rozrodczym (wrzesień–październik) a okresem poza sezonem rozrodczym (grudzień–luty).

7. Tkanki jąder oraz najądrzy (głowy, trzonu i ogona) jelenia europejskiego posiadają sprawny system obrony antyoksydacyjnej oparty na SOD, GPx i CAT. Jego funkcjonowanie jest ściśle skorelowane z cyklem sezonowym i wzrasta znacząco w okresie rykowiska.

Spis literatury

Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology, 3*, 28. https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28

Agarwal, A., Saleh, R. A., Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, *79*, 829–843. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04948-8

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, *32*, 1–17. https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1

Aitken, R. J., Buckingham, D. W., Carreras, A., Irvine, D. S. (1996). Superoxide dismutase in human sperm suspensions: Relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biology & Medicine*, *21*, 495–504. https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00119-0

Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development*, *28*, 1–10. https://doi.org/10.1071/rd15325

Aitken, R. J., Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *1*, 15–24. https://doi.org/10.4161/oxim.1.1.6843

Aitken, R. J., Vernet, P. (1998). Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *53*, 109–118.

Akhter, S., Rakha, B. A., Iqbal, R., Ansari, M. S. (2014). Effect of bovine serum albumin on motility, plasmalemma, viability and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology*, *46*, 115–120.

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*, 338–348. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1987.tb00973.x

Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M., Rodriquez-Martinez, H. (2006). Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*, *29*, 543–552. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00694.x

Asher, G. W., Berg, D. R., Evans, G., Salamon, S., Maxwell, W. (2000). Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal Reproduction Science*, *62*, 195–211. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00159-7

Barbagallo, F., La Vignera, S., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A. E., Condorelli, R. A. (2020). Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility. *Journal of Clinical Medicine*, *9*, 363. https://doi.org/10.3390/jcm9020363

Barik, G., Chaturvedula, L., Bobby, Z. (2019). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility: An interventional study. *Journal of Human Reproductive Sciences*, *12*(3), 204–209. https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_135_18

Barrell, G. K., Muir, P. D., Sykes, A. R. (1985). Seasonal profiles of plasma testosterone, prolactin and growth hormone in red deer stags. W *Biology of deer production* (Bulletin 22, s. 135–190). The Royal Society of New Zealand.

Bartosz, G. (2013). *Druga twarz tlenu: Wolne rodniki w przyrodzie* (wyd. 2). Wydawnictwo Naukowe PWN.

Bayomy, M. F. F., El-Nabi, S. E. H., El Kassas, T. A., Attia, Z. I., Saeed, A. M., Taha, H. S. A., Alagawany, M., Galosi, L., Biagini, L., El-Kassas, S. (2023). Extender supplementation with glutathione (GSH) and taurine improves *in vitro* sperm quality and antioxidant status of New Zealand rabbits during chilled storage for up to 72 hours. *Veterinary Medicine International*, *2023*, 8339591. https://doi.org/10.1155/2023/8339591

Belleannée, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Gatti, J. L., Dacheux, J. L., Dacheux, F. (2011). Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *Journal of Proteomics*, *74*, 59–78. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.013

Belleannèe, C., Thimon, V., Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and Tissue Research*, *349*, 717–731. https://doi.org/10.1007/s00441-012-1381-0

Bergeron, A., Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, *73*(10), 1338–1344. https://doi.org/10.1002/mrd.20565

Bhattacharyya, H. K., Goswami, B. K., Bujarbaruah, K. M., Deka, B. C., Biswas, R. K. (2009). Collection and characterization of semen in Mithun (*Bos frontalis*) bulls. *Theriogenology*, *72*, 699–703. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.010

Bielas, W. (2002). Wpływ różnych metod konserwacji nasienia knura w niskich temperaturach na wybrane właściwości plemników. *Acta Scientiarum Polonorum. Medicina Veterinaria*, *2*, 13–22.

Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, *55*, 282–288. https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(200003)55:3%3C282::aid-mrd6%3E3.0.co;2-7

Bobek, B., Morow, K., Perzanowski, K., Kosobucka, M. (1992). *Jeleń*. Wydawnictwo Świat.

Bombik, S., Kondracki, S. (2007). Znaczenie hodowli zwierząt wolno żyjących (cz. II). *Przegląd Hodowlany*, *2*, 25–29.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, *7*, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cassani, P., Beconi, M. T., O'Flaherty, C. (2005). Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Animal Reproduction Science*, *86*, 163–173. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.06.006

Castellini, C., D'Andrea, S., Cordeschi, G., Totaro, M., Parisi, A., Di Emidio, G., Tatone, C., Francavilla, S., Barbonetti, A. (2021). Pathophysiology of mitochondrial dysfunction in human spermatozoa: focus on energetic metabolism, oxidative stress and apoptosis. *Antioxidants*, *10*, 695. https://doi.org/10.3390/antiox10050695

Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., Drevet, J. R. (2010). Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science*, *88*, 1321–1331. https://doi.org/10.2527/jas.2009-2583

Cheng, F. P., Wu, J.T., Chan J. P., Wang, J. S., Fung, H. P., Colenbrander, B., Tung, K. C. (2004). The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology*, *61*(9), 1605–1616. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.015

Cilulko, J. (2011). Rozród jeleniowatych. Cz.1 Wybrane aspekty biologii rozrodu. *Przegląd Hodowlany*, *5*, 26–31.

Comizzoli, P., Mermillod, P., Cognié, Y., Chai, N., Legendre, X., Mauget, R. (2001). Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology*, *55*, 649–659. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00433-2

Conejo-Nava, J., Fierro, R., Gutierrez, C. G., Betancourt, M. (2003). Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16°C. *Archives of Andrology*, *49*, 287–295. https://doi.org/10.1080/01485010390204931

Cooper, T. G., Yeung, C.-H., Fetic, S., Sobhani, A., Nieschlag, E. (2004). Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Human Reproduction*, *19*, 2283–2288. https://doi.org/10.1093/humrep/deh410

Coyan, K., Başpınar, N., Bucak, M. N., Akalin, P. P., Ataman, M. B., Omür, A. D., Güngör, S., Küçükgünay, S., Ozkalp, B., Sarıözkan, S. (2010). Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during

liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*, *89*, 426–431. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.025

Del Prete, C., Prieto, O. B., Mislei, B., Iacono, E., Mari, G., Cocchia, N., Gasparrini, B., Merlo, B., Bucci, D. (2022). Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. *Animal Reproduction Science*, *247*, 107089. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107089

Demianowicz, W., Giżejewski, Z., Kubiak, D., Kowalski, R., Głogowski, J. (2008). Doskonalenie kriokonserwacji nasienia jelenia szlachetnego pobranego metodą sztucznej pochwy. *Medycyna Weterynaryjna, 64*(4B), 608–612.

Domínguez-Rebolledo, A. E., Fernández-Santos, M. R., Bisbal, A., Ros-Santaella, J. L., Ramón, M., Carmona, M., Martínez-Pastor, F., Garde, J. J. (2010). Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction, Fertility, and Development*, *22*, 856–870. https://doi.org/10.1071/rd09197

Dott, H. M., Foster, G. C. A. (1979). The estimation of sperm motility in semen on membrane slide by measuring the area change frequency with inn image analysing computer. *Journal of Reproduction and Fertility*, *55*, 161–166. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0550161

Drevet, J. R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *250*, 70–79. https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.027

Dubiel, A., Niżański, W., Kozdrowski, R., Pietrzak, G., Dmuchowski, B. (2002). Obserwacje nad właściwościami i konserwacją nasienia jeleni w niskich temperaturach. *Życie weterynaryjne*, *77*, 87–90.

Durairajanayagam, D., Singh, D., Agarwal, A., Henkel, R. (2021). Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*, *53*, e13666. https://doi.org/10.1111/and.13666

Dziekońska, A., Fraser, L., Koziorowska-Gilun, M., Strzezek, J., Koziorowski, M., Kordan, W. (2014). Seasonal-dependent variations in metabolic status of spermatozoa and antioxidant enzyme activity in the reproductive tract fluids of wild boar/domestic pig hybrids. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *17*, 307–313. https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0042

Dziekońska, A., Kinder, M., Fraser, L., Strzeżek, J., Kordan, W. (2017). Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins. *Journal of Veterinary Research*, *61*, 127–133. https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0016

Dziekońska, A., Koziorowska-Gilun, M., Kordan, W., Neuman, N. M., Kotlarczyk, A. M., Korzekwa, A. J. (2022a). The quality and fertilizing potential of red deer (*Cervus*

elaphus L.) epididymal spermatozoa stored in a liquid state. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*, 14591. https://doi.org/10.3390/ijms232314591

Dziekońska, A., Lecewicz, M., Partyka, A., Niżański, W. (2023). Fluorescence microscopy and flow-cytometry assessment of substructures in European red deer epididymal spermatozoa after cryopreservation. *Animals*, *13*, 990. https://doi.org/10.3390/ani13060990

Dziekońska, A., Neuman, N. M., Burdal, K. K., Wiszniewska-Łaszczych, A., Bogdaszewski, M. (2022b). The effect of different extenders on the quality characteristics of European red deer epididymal sperm stored at 5°C. *Animals*, *12*, 2669. https://doi.org/10.3390/ani12192669

Dziekońska, A., Niedźwiedzka, E., Niklewska, M. E., Koziorowska-Gilun, M., Kordan, W. (2020). Viability longevity and quality of epididymal sperm stored in liquid state of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). *Animal Reproduction Science*, *213*, 106269. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106269

Estienne, M. J., Harper, A. F., Day, J. L. (2007). Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18 ºC. *Reproductive Biology*, *7*, 221–231.

Foresta, C., Flohe, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F., Maiorino, M. (2002). Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of Reproduction*, *67*, 967–971. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.003822

Foote, R. H., (2000). Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals. *Journal of Andrology*, *21*, 355. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03388.x

Fernández-Santos, M. R., Domínguez-Rebolledo, A. E., Esteso, M. C., Garde, J. J., Martínez-Pastor, F. (2009). Refrigerated storage of red deer epididymal spermatozoa in the epididymis, diluted and with vitamin C supplementation. *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(2), 212–220. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01032.x

Fernández-Santos, M. R., Esteso, M. C., Soler, A. J., Montoro, V., Garde, J. J. (2006). Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, *41*(2), 114–118. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00649.x

Fraser, L., Dziekońska, A., Strzeżek, R., Strzeżek, J. (2007). Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*, *67*(5), 994–1003. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.002

Frączek, M., Kurpisz, M. (2005). The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, *59*, 523–534.

Gadea, J. (2003). Semen extenders used in artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *1*, 17–27. https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17

Gadea, J., Sellés, E., Marco, M. A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., Ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, *62*, 690–701. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.013

Garde, J., Martínez-Pastor, F., Gomendio, M., Malo, A., Soler, A., Fernández-Santos, M., Esteo, M., García, A., Anel, L., Roldan, E. (2006). The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. *Reproduction in Domestic Animals*, *41*, 93–102. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00773.x

Garde, J. J., Soler, A. J., Cassinello, J., Crespo, C., Malo, A. F., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E. R. (2003). Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr*, and *G. dorcas neglecta*). *Biology of Reproduction*, *69*, 602–611. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.012914

Gerlach, T., Aurich, J. (2000). Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, *58*, 197–213. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00093-7

Giżejewski, Z. (2002). *Wpływ sezonu na ilościowe i jakościowe cechy nasienia jelenia szlachetnego (Cervus elaphus* L.*) z uwzględnieniem zachowania płciowego* [Rozprawa habilitacyjna]. Wydawnictwo UWM.

Giżejewski, Z. (2004). Effect of season on characteristics of red deer /*Cervus elaphus* L./ semen collected using modified artificial vagina. *Reproductive Biology*, *4*, 51–66.

Godlewski, S. (1989). *Vademecum myśliwego* (wyd. 2). Wydawnictwo Ministerstwa Obrony Narodowej.

Goeritz, F., Quest, M., Wagener, A., Fassbender, M., Broich, A., Hildebrandt, T. B., Hofmann, R. R., Blottner, S. (2003). Seasonal timing of sperm production in roe deer: Interrelationship between changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology*, *59*, 1487–1502. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01201-3

Gotowiecka, M., Niżański, W., Partyka, A., Strzeżek, R., Koziorowska-Gilun, M. (2015a). Ocena wpływu stresu oksydacyjnego na nasienie zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna*, *71*, 743–747.

Gotowiecka, M., Niżański, W., Partyka, A., Strzeżek, R., Koziorowska-Gilun, M. (2015b). Mechanizm obrony antyoksydacyjnej i oddziaływanie reaktywnych form tlenu na plemniki samców zwierząt domowych. *Medycyna Weterynaryjna*, *71*, 418–422.

Grignard, E., Morin, J., Vernet, P., Drevet, J. R. (2005). GPx5 orthologs of the mouse epididymis-restricted and sperm-bound selenium-independent glutathione peroxidase are not expressed with the same quantitative and spatial characteristics in large domestic animals. *Theriogenology*, *64*, 1016–1033. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.008

Haigh, J. C. (2007). Reproductive anatomy and physiology of male wapiti and red deer. W R. S. Youngquist i W. R. Threlfall (red.), *Current therapy in large animal theriogenology,* (s. 932–936). Saunders Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50129-X

Hashem, E. Z., Haddad, R., Eslami, M. (2017). Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Ruminant Research*, *150*, 30–39. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.002

Herst, P. M., Rowe, M. R., Carson, G. M., Berridge, M. V. (2017). Functional mitochondria in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 296. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00296

Hinrichs, K., Loux, S. C. (2012). Hyperactivated sperm motility: Are equine sperm different? J*ournal of Equine Veterinary Science*, *32*, 441–444. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.070

Hishinuma, M., Suzuki, K., Sekine, J. (2003). Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology*, *59*(3–4), 813–820. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01154-8

Janiszewski, P., Bogdaszewska, Z., Bogdaszewski, M., Bogdaszewski, P., Ciulko-Dołęga, J., Nasiadka, P., Steiner, Ż. (2014). *Chów i Hodowla Fermowa Jeleniowatych*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, 1–167.

Janiszewski, P., Daszkiewicz, T. (2008). *Zwierzyna gruba. Zasady prawidłowego pozyskiwania*. Wydawnictwo Mantis.

Jaroszewska, J. (2011). Rozcieńczalniki do przechowywania nasienia knura. *Przegląd Hodowlany*, *2/2011*, 21–24.

Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P., Laval-Martin, D., Calvayrac, R. (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*, *24*, 185–196. https://doi.org/10.1002/mrd.1120240206

Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science, 62*, 143–172. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00157-3

Jones, P. L., Kucera, G., Gordon, H., Boss, J. M. (1995). Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene. *Gene*, *153*, 155–161. https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00666-g

Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J., Aurich, C. (2005). Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, *63*, 1354–1365. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.005

Kiryjow, J., Matysek, W., Wierzbieniec, A., Dzięciołowski, R., Flis, M. (2011). *Łowiectwo* (T. 1). Łowiec Polski.

Kozioł, K., Koziorowski, M. (2013). Steroid hormones in peripheral blood plasma and androgen receptors in testis and epididymis of roe deer male (*Capreolus capreolus*) during the reproduction season. *Small Ruminant Research*, *115*, 86–93. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.09.008

Kozioł, K., Koziorowski, M. (2015). Morphological defects of epididymal spermatozoa in male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the reproductive season. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *18*, 565–572. https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0073

Koziorowska-Gilun, M., Fraser, L., Gilun, P., Koziorowski, M., Kordan, W. (2015). Activity of antioxidant enzymes and their mRNA expression in different reproductive tract tissues of the male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the pre-rut and rut season. *Small Ruminant Research*, *129*, 97–103. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.05.006

Koziorowska-Gilun, M., Gilun, P., Fraser, L., Koziorowski, M., Kordan, W., Stefanczyk-Krzymowska, S. (2013). Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in reproductive tract of adult male European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Reproduction in Domestic Animals*, *48*, 7–14. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02015.x

Koziorowska-Gilun, M., Gilun, P., Mietelska, K., Kordan, W. (2018). Determination of the activity and relative abundance of mRNA for antioxidant enzymes in stallion testicular and epididymal tissues: A comparison between two breeding seasons. *Animal Reproduction Science*, *196*, 230–238. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.015

Koziorowska-Gilun, M., Koziorowski, M., Fraser, L., Strzeżek, J. (2011). Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*, 527–533. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01701.x

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*, 248–254. https://doi.org/10.1111/rda.12673

Krysiak, K., Świeżyński, K. (2009). *Anatomia zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Kwiecińska, K., Kosicka-Gębska, M., Gębski, J. (2018). Dostępność dziczyzny na polskim rynku w kontekście potrzeb konsumentów. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego Ekonomika i Organizacja Gospodarki Żywnościowej*, *121*, 83–91.

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

Lambertucci, R. H., Levada-Pires, A. C., Rossoni, L. V., Curi, R., Pithon-Curi, T. C. (2007). Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels

in soleus muscle from young and aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, *128*, 267–275. https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.12.006

Lange-Consiglio, A., Meucci, A., Cremonesi, F. (2013). Fluorescent multiple staining and CASA system to assess boar sperm viability and membranes integrity in short and long-term extenders. *Open Veterinary Journal*, *3*, 21–35.

Larson-Cook, K. L., Brannian, J. D., Hansen, K. A., Kasperson, K. M., Aamold, E. D., Evenson, D. P. (2003). Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, *80*, 895–902. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)01116-6

Li, R., Fan, X., Zhang, T., Song, H., Bian, X., Nai, R., Li, J., Zhang, J. (2018). Expression of selenium-independent glutathione peroxidase 5 (GPx5) in the epididymis of Small Tail Han sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, *31*, 1591–1597. https://doi.org/10.5713/ajas.18.0015

Lincoln, G. (2010). The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Journal of Zoology*, *163*, 105–123. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1971.tb04527.x

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G., Casper, R.F. (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, *4*, 896–900. https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.896

Love, C. C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, *76*, 547–557. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.007

Luan, Z., Fan, X., Song, H., Li, R., Zhang, W., Zhang, J. (2019). Testosterone promotes GPX5 expression of goat epididymal epithelial cells cultured in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Animal*, *55*, 677–685. https://doi.org/10.1007/s11626-019-00391-y

Łuszczewski, A., Matyska-Piekarska, E., Trefler, J., Wawer, I., Łącki, J., Śliwińska-Stańczyk, P. (2007). Reaktywne formy tlenu - znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia*, *45*, 284–289.

Mackintosh, C. G., Cowie, C., Fraser, K., Johstone, P., Mason, P. C. (2014). Reduced efficacy of moxidectin and abamectin in young red deer (*Cervus elaphus*) after 20 years of moxidectin pour-on use on a New Zealand deer farm. *Veterinary Parasitology*, *199*, 81–92. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.028

Malo, A. F., Garde, J. J., Soler, A. J., García, A. J., Gomendio, M. (2005). Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *72*, 822–829. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036368

Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Ménard, M. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, *67*, 1250–1258.

Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defossez, A., Formstecher, P., Marchetti, P. (2004). Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*, *19*, 2267–2276. https://doi.org/10.1093/humrep/deh416

Marchlewicz, M., Szypulska-Koziarska, D., Grzegrzółka, A., Kruk, J., Duchnik, E., Wiszniewska, B. (2016). Ochrona przed stresem oksydacyjnym w męskim układzie płciowym. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, *62*, 44–52. https://doi.org/10.21164/pomjlifesci.169

Martínez, A. F., Martínez-Pastor, F., Alvarez, M., Fernández-Santos, M. R., Esteso, M. C., de Paz, P., Garde, J. J., Anel, L. (2008). Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology*, *70*(2), 216–226. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.001

Martínez, I. N., Morán, J. M., Peña, F. J. (2006). Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *Journal of Andrology*, *27*, 596–603. https://doi.org/10.2164/jandrol.05153

Martínez-Pastor, F., Diaz-Corujo, A. R., Anel, E., Herraez, P., Anel, L., de Paz, P. (2005a). Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*, *64*, 958–974. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.003

Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., del Olmo, E., Domínguez-Rebolledo, A. E., Esteso, M. C., Montoro, V., Garde, J. J. (2008). Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. *Reproduction, Fertility, and Development*, *20*, 547–556. https://doi.org/10.1071/rd08002

Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraez, P., de Paz, P., Anel, L. (2006b). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, *65*(3), 471–485. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.045

Martínez-Pastor, F., Guerra, C., Kaabi, M., Garcia-Macias, V., de Paz, P., Alvarez, M., Herraez, P., Anel, L. (2005b). Season effect on genitalia and epididymal sperm from Iberian red deer, roe deer and Cantabrian chamois. *Theriogenology*, *63*, 1857–1875. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.006

Martínez-Pastor, F., Martínez, F., Alvarez, M., Maroto-Morales, A., García-Alvarez, O., Soler, A. J., Garde, J. J., de Paz, P., Anel, L. (2009). Cryopreservation of Iberian red deer

(*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology*, *71*, 628–638. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.033

Maside, C., Recuero, S., Salas-Huetos, A., Ribas-Maynou, J., Yeste, M. (2023). Animal board invited review: An update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab. *Animal*, *17*(3), 100720. https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100720

Mocé, E., Graham, J. K., (2008). *In vitro* evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, *105*, 104–118. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.016

Mruk, D. D., Silvestini, B., Mo, M. Y., Cheng, C. Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase—A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, *65*, 305–311. https://doi.org/10.1016/s0010-7824(01)00320-1

Muratori, M., Forti, G., Baldi, E. (2008). Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *73*, 785–787. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20615

Nair, S. J., Brar, A. S., Ahuja, C. S., Sangha, S. P. S., Chaudhary, K. C. (2006). A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*, *96*, 21–29. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.11.002

Neild, D. M., Brouwers, J. F. H. M., Colenbrander, B., Agüero, A., Gadella, B. M. (2005). Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, *72*, 230–238. https://doi.org/10.1002/mrd.20322

Nguyen, V. V., Ponchunchoovong, S., Kupittayanant, S., Kupittayanant, P. (2019). Effects of egg yolk soybean lecithin on sperm quality determined by computer-assisted sperm analysis and confocal laser scanning microscope in chilled canine sperm. *Veterinary Medicine and Science*, *5*, 345–360. https://doi.org/10.1002/vms3.158

Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C. H., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Conrad, M., Drevet, J. R., Kocer, A. (2012). Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One*, *7*, 38565. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038565

Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T., Yoshida, O. (1992). Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Human Reproduction*, *7*, 81–85. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137565

Okamura, N., Iwaki, Y., Hiramoto, S., Tamba, M., Bannai, S., Sugita, Y., Syntin, P., Dacheux, F., Dacheux, J. L. (1997). Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid.

Biochimica et Biophysica Acta, *1336*, 99–109. https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00016-0

Partyka, A., Łukaszewicz, E., Niżański, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, *77*, 1497–1504. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006

Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J., Niżański, W. (2017). The Effect of L-carnitine, hypotaurine, and taurine supplementation on the quality of cryopreserved chicken semen. *BioMed Research International*, *2017*, 7279341. https://doi.org/10.1155/2017/7279341

Pasławski, T. (1987). *Podręcznik selekcjonera zwierzyny*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa.

Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R., Berg, K. A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, *57*, 823–836. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00683-5

Peltola, V., Huhtaniemi, I., Metsa-Ketela, T., Ahotupa, M. (1996). Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrinology*, *137*, 105–112. https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536600

Perumal, P. (2014). Effect of superoxide dismutase on semen parameters and antioxidant enzyme activities of liquid stored (5°C) Mithun (*Bos frontalis*) semen. *Journal of Animals*, *2014*, 821954. https://doi.org/10.1155/2014/821954

Pintus, E., Ros-Santaella, J. L. (2014). Assisted reproductive technologies in deer (Artiodactyla, Cervidae): A review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, *45*(2), 136–146. https://doi.org/10.7160/sab.2014.450210

Plante, G., Prud'homme, B., Fan, J., Lafleur, M., Manjunath, P. (2016). Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell and Tissue Research*, *363*, 105–127. https://doi.org/10.1007/s00441-015-2289-2

Prieto, M. T., Sanchez-Calabuig, M. J., Hildebrandt, T. B., Santiago-Moreno, J., Saragusty, J. (2014). Sperm cryopreservation in wild animals. *European Journal of Wildlife Research*, *60*, 851–864. https://doi.org/10.1007/s10344-014-0858-4

Quan, X., Lim, S.-O., Jung, G. (2011). Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG Island in the Oct-1 promoter. *FEBS Letters*, *585*, 3436–3441. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.035

Reglero, M. M., Taggart, M. A., Castellanos, P., Mateo, R. (2009). Reduced sperm quality in relation to oxidative stress in red deer from a lead mining area. *Environmental Pollution*, *157*, 2209–2215. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.017

Rodríguez-Gil, J. E., Bonet, S. (2016). Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, *85*, 4–11. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.005

Roelants, H., Schneider, F., Göritz, F., Streich, J., Blottner, S. (2002). Seasonal changes of spermatogonial proliferation in roe deer, demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone. *Biology of Reproduction*, *67*, 305–312. https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.305

Ros-Santaella, J. L., Domínguez-Rebolledo, A. E., Garde, J. J. (2014). Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa. *PLoS One*, *9*, e112382. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112382

Sadeghi, M. R., Hodjat, M., Lakpour, N., Arefi, S., Amirjannati, N., Modarresi, T., Jadda, H. H., Akhondi, M. M. (2009). Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *1*, 173–180.

Saenz, J. R. (2007). Cryopreservation of white-tail deer epididymal sperm for artificial insemination. *LSU Master's Theses*, 3362. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/3362

Salamon, S., Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, *62*, 77–111. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00155-x

Shamsi, M. B., Imam, S. I., Dada, R. (2011). Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *28*, 1073–1085. https://doi.org/10.1007%2Fs10815-011-9631-8

Shukla, K. K., Mahdi, A. A., Rajender, S. (2012). Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience*, *4*, 746–754. https://doi.org/10.2741/415

Soler, A. J., Esteso, M. C., Fernández-Santos, M. R., Garde, J. J., (2005). Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. *Theriogenology*, *64*, 1503–1517. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.013

Soler, A. J., Pérez-Guzmán, M. D., Garde, J. J. (2003). Storage of Red Deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. *Journal of Experimental Zoology*, *295*(2), 188–199. https://doi.org/10.1002/jez.a.10194

Strzeżek, J. (1987). Wybrane układy enzymatyczne nasienia zwierząt gospodarskich w aspekcie doskonalenia jego konserwacji oraz płodności samca. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, *340*, 9–40.

Strzeżek, R., Koziorowska-Gilun, M., Kowalówka, M., Strzeżek, J. (2009). Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *12*, 55–60.

Suarez, S. S., Ho, H.-C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *38*, 119–124. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00397.x

Taylor, C. T. (2001). Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *10*, 189–198. https://doi.org/10.1016/s1382-6689(01)00099-0

Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., Panfili, E. (1998). Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, *59*, 753–758. https://doi.org/10.1095/biolreprod59.4.753

Trzcińska, M., Bryła, M., Smorąg, Z. (2011). Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced in vivo. *Animal Reproduction Science*, *124*, 90–97. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.016

Tsutsui, T., Tezuka, T., Mikasa, Y., Sugisawa, H., Kirihara, N., Hori, T., Kawakami, E. (2003). Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *65*, 307–312. https://doi.org/10.1292/jvms.65.307

Vernet, P., Aitken, R. J., Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *216*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069

Volpe, S., Leoci, R., Aiudi, G., Lacalandra, G. M. (2009). Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals, 44*, 275–278. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01457.x

Watson, P. F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *The Veterinary Record*, *97*, 12–15. https://doi.org/10.1136/vr.97.1.12

Wild, D. E. (2000). Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. *ILAR Journal*, *41*, 228–234. https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.228

Williams, K., Frayne, J., Hall, L. (1998a). Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Molecular Human Reproduction*, *4*, 841–848. https://doi.org/10.1093/molehr/4.9.841

Williams, K., Frayne, J., McLaughlin, E., Hall, L. (1998b). Expression of extracellular superoxide dismutase in the human reproductive tract, detected using antisera against a recombinant protein. *Molecular Human Reproduction*, *4*, 235–242. https://doi.org/10.1093/molehr/4.3.235

Wysokińska, A., Szablicka, D., Dziekońska, A., Wójcik, E. (2023). Analysis of changes in the morphological structures of sperm during preservation of liquid boar semen in two different seasons of the year. *Animal Reproduction Science*, *256*, 107297. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107297

Xu, H., Yuan, S.-Q., Zheng, Z.-H., Yan, W. (2013). The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian Journal of Andrology*, *15*(6), 799–805. https://doi.org/10.1038/aja.2013.69

Yániz, J. L., Mateos, J. A., Santolaria, P. (2010). Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. *Small Ruminant Research*, *95,* 54–60. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.08.006

Yuan, S., Zheng, H., Zheng, Z., Yan, W. (2013). Proteomic analyses reveal a role of cytoplasmic droplets as an energy source during epididymal sperm maturation. *PLoS One*, *8*, e77466. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077466

Zhao, S., Fernald, R. (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, *12*, 1045–1062. https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047

Zini, A., Schlegel, P. N. (1996). Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *Journal of Andrology*, *17*, 473–480.

Zomborszky, Z., Nagy, S., Nánássy, L., Szabari, M., Bodó, S. (2005). Experiences in deer sperm cryopreservation under practical conditions – a pilot study. *Animal Reproduction Science*, *90*, 185–190. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.014

Spis tabel i figur

Tabele:

Tabela 1. Sekwencje syntetycznych starterów użytych do badania ekspresji genów w tkankach układu rozrodczego jelenia europejskiego metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) w czasie rzeczywistym. Każdy zestaw starterów został zaprojektowany zgodnie z numerem dostępowym podanym w bazie danych Europejskiego Laboratorium Biologii Molekularnej.

Tabela 2. Współczynniki korelacji opisujące zależności między parametrami jakości plemników najądrzowych jelenia europejskiego przechowywanych w stanie płynnym w temperaturze 5°C przez 144 godziny.

Tabela 3. Współczynniki korelacji opisujące zależności między parametrami jakości plemników najądrzowych jelenia europejskiego przechowywanych w najądrzach w temperaturze 5°C przez 144 godziny.

Tabela 4. Wpływ wariantu przechowywania (stan ciekły vs. przechowywanie w najądrzach) na ruchliwość, żywotność, morfologię i status antyoksydacyjny plemników jelenia szlachetnego europejskiego przechowywanych w temperaturze 5°C.

Tabela 5. Wpływ sezonu oraz rodzaju tkanki na aktywność enzymów w analizie wariancji ANOVA.

Tabela 6. Wpływ sezonu oraz rodzaju tkanki na ekspresję genów w analizie wariancji ANOVA.

Rysunki:

Rysunek 1. Ruchliwość i parametry ruchu plemników przechowywanych w najądrzu oraz w stanie ciekłym w temperaturze 5°C (n = 36).

Rysunek 2. Integralność błony plazmatycznej, potencjał błony mitochondrialnej, integralność błony akrosomalnej, integralność DNA i zmiany o charakterze apoptotycznym w plemnikach przechowywanych w najądrzu i w stanie płynnym w temperaturze 5°C (n = 36).

Rysunek 3. Wpływ czasu przechowywania na ruchliwość i żywotność plemników przechowywanych w stanie ciekłym i w najądrzu w temperaturze 5°C.

Rysunek 4. Wpływ czasu przechowywania na morfologię plemników przechowywanych w stanie płynnym i w najądrzach w temperaturze 5°C.

Rysunek 5. Wpływ czasu przechowywania na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i peroksydację lipidów w plemnikach przechowywanych w stanie ciekłym i w najądrzach w temperaturze 5°C.

Rysunek 6. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach układu rozrodczego jelenia europejskiego podczas sezonu rozrodczego oraz poza sezonem rozrodczym.

Rysunek 7. Względna ilość mRNA dla analizowanych genów w tkankach rozrodczych jelenia europejskiego w sezonie rozrodczym i poza nim.

Rysunek 8. Analiza Western blot dysmutazy ponadtlenkowej 1 (SOD1), dysmutazy ponadtlenkowej 2 (SOD2), dysmutazy ponadtlenkowej 3 (SOD3), peroksydazy glutationowej 4 (GPx4), peroksydazy glutationowej 5 (GPx5) i katalazy (CAT) w jądrze (A), głowie najądrza (B), trzonie najądrza (C) i ogonie najądrza (D) w sezonie rozrodczym (n = 5) i poza sezonem rozrodczym (n = 5).

Schematy:

Schemat 1. Etapy przeprowadzonych badań w ramach cyklu publikacji naukowych składających się na rozprawę doktorską.

Oświadczenia

Olsztyn, 27.02.2026 r.

mgr inż. Nicoletta Magdalena Neuman
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem **„Właściwości biologiczne najądrzowych plemników poddanych różnym procedurom technologicznym oraz status antyoksydacyjny jąder i najądrzy jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*)"** została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

.....Neuman Nicoletta.....
(podpis kandydata)

Olsztyn, 27.02.2026 r.

dr hab. Anna Dziekońska, prof. UWM
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman pod tytułem: **Właściwości biologiczne najądrzowych plemników poddanych różnym procedurom technologicznym oraz status antyoksydacyjny jąder i najądrzy jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*)** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

.....
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Olsztyn, 27.02.2026 r.

dr Przemysław Gilun
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman pod tytułem: **Właściwości biologiczne najądrzowych plemników poddanych różnym procedurom technologicznym oraz status antyoksydacyjny jąder i najądrzy jelenia europejskiego (*Cervus elaphus elaphus*)** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Przemysław Gilun
.....
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Załączniki

Pełne teksty publikacji stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów

Lista załączników:

1. **Załącznik 1**: Pełny tekst publikacji 1 (P1) wraz z oświadczeniami współautorów.
2. **Załącznik 2**: Pełny tekst publikacji 2 (P2) wraz z oświadczeniami współautorów.
3. **Załącznik 3**: Pełny tekst publikacji 3 (P3) wraz z oświadczeniami współautorów.

ZAŁĄCZNIK 1

PUBLIKACJA 1 (P1)

Neuman, N. M., Dziekońska, A., Orzołek, A., Gilun, P. (2024). A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5°C. *Animal Reproduction Science*, *260*, 107387. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387

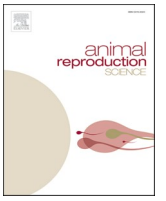
Animal Reproduction Science 260 (2024) 107387



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci





A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5 °C

Nicoletta M. Neuman [a], Anna Dziekońska [a,*], Aleksandra Orzołek [a], Przemysław Gilun [b]

[a] *Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland*
[b] *Department of Local Physiological Regulations, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland*

ARTICLE INFO

Keywords:
European red deer
Epididymal sperm
Epididymides
Storage
Quality

ABSTRACT

The biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state were compared. Spermatozoa were collected from the epididymides harvested post-mortem. In the first variant, spermatozoa were diluted in two extenders (Bovidyl® and Salomon's), and were stored at 5 °C for up to 144 h. In the second variant, spermatozoa were stored in the epididymides at 5 °C for up to 144 h, and then diluted in the same extenders. Biological properties were evaluated after 0, 48, 96, and 144 h of storage. Sperm motility parameters were determined in the CASA system. Plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity, apoptotic changes, and DNA integrity were assessed by the fluorescence method. Most variables were significantly influenced by the storage method and time. At 144 h, differences ($P \leq 0.05$) in sperm parameters were observed between storage variants. Total motility (TMOT), plasma membrane integrity, and mitochondrial activity decreased below 50% of baseline values in the spermatozoa stored in the epididymides, but remained above 70% of baseline values in the spermatozoa stored in a liquid state. The compared storage variants did not differ in TMOT, mitochondrial activity, or the percentage of viable spermatozoa without apoptotic-like changes up to 96 h of storage, regardless of the applied extender. The earliest significant changes were noted in sperm motility parameters. In conclusion, European red deer spermatozoa can be stored in the epididymides at 5 °C for up to 96 h, but their biological parameters are more effectively preserved during liquid storage.

1. Introduction

The knowledge about reproduction in free-living animals is still limited and requires further research. Semen can be stored for prolonged periods to preserve and use genetic material for reproductive purposes.

Cervid spermatozoa can be preserved with the use of various techniques, including cryopreservation (Martinez-Pastor et al., 2006;

* Correspondence to: Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Faculty of Animal Bioengineering, Oczapowskiego 5, 10–957 Olsztyn, Poland.
E-mail address: a.dziekonska@uwm.edu.pl (A. Dziekońska).

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387
Received 28 August 2023; Accepted 27 November 2023
Available online 29 November 2023
0378-4320/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Fernández-Santos et al., 2006a, 2007), liquid storage at low temperatures (Soler et al., 2005; Dziekońska et al., 2020, 2022b), and storage in the epididymides (Soler et al., 2005; Fernández-Santos et al., 2009). Gamete and embryo storage in liquid nitrogen is the most recommended method for long-term preservation of genetic material (Watson et al., 2001). The application of this method is not always feasible due to technical and economic constraints, and other semen storage techniques can be useful for preserving genetic material for reproductive purposes.

Ejaculated semen is best suited for preservation, but semen samples are difficult to obtain from free-living animals. Spermatozoa can also be collected post-mortem from the cauda epididymis of culled animals. Despite certain differences in sperm motility and the composition and integrity of the plasma membrane (Gloria et al., 2011), epididymal spermatozoa retain their fertilizing capacity (Comizzoli et al., 2001; Abella et al., 2015; Dziekońska et al., 2022a). In addition, semen samples collected post-mortem from hunter-harvested animals in their natural habitat can also contribute to breeding progress (Garde et al., 2006). Yet, research has shown that the harvested gametes deteriorate rapidly (Kaabi et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2005b). Changes in the quality parameters of stored semen have not been sufficiently investigated to date. According to many studies, spermatozoa retain their functions for many hours after the animal's death (Songsasen et al., 1998; Kishikawa et al., 1999; Yu and Leibo, 2002; Kaabi et al., 2003; Soler et al., 2003, 2005).

The survival of epididymal spermatozoa is influenced by storage conditions (time and temperature) (Soler et al., 2005). Spermatozoa harvested from bull epididymides and stored for 72 h can be used for cryopreservation and in vitro fertilization (Martins et al., 2009). Spermatozoa stored in the epididymides of Sika deer can also be used in assisted reproduction technologies (Hishinuma et al., 2003).

The quality of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides has not been investigated to date, and most research studies analyzed cryopreserved spermatozoa and spermatozoa stored in a liquid state (Dziekońska et al., 2020, 2022b, 2023). The results of previous studies conducted on other subspecies of red deer, mainly the Iberian red deer (Soler et al., 2005; Fernández-Santos et al., 2006a, 2007, 2009), suggest that red deer spermatozoa can also be stored in the epididymides for more than 10 h or even for several days.

The aim of this study was to compare the biological properties of European red deer spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at a temperature of 5 °C. Sperm motility, plasma and acrosomal membrane integrity, apoptotic changes, mitochondrial

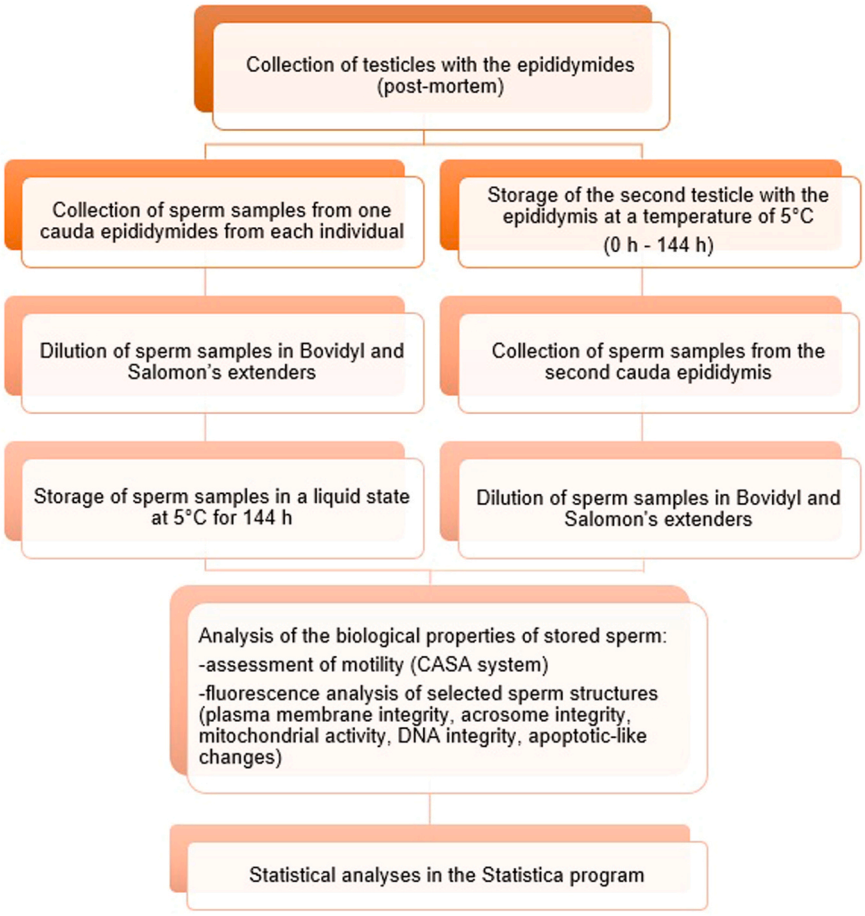


Fig. 1. Experimental design.

activity, and DNA integrity were determined in spermatozoa stored for up to 144 h.

2. Materials and methods

2.1. Animals and collection of sperm samples

Samples of epididymal spermatozoa were collected post-mortem from 36 European red deer stags. The animals were legally culled during hunts (rutting season; September-October) in Nowe Ramuki Forest District (Region of Warmia and Mazury, Poland). The animals were harvested in accordance with hunting laws and wildlife management regulations. Hunting plans were consistent with the provisions of the Act of 13 October 1995 (Hunting Law) on game and wildlife conservation in line with environmental protection guidelines and sustainable agriculture, forestry, and fishery practices (the amended law is consistent with European Union legislation).

Testicles with epididymides (stored in the scrotal sac) were transported to the laboratory of the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, within 5 h after culling.

Sperm samples were collected according to a previously described method (Dziekońska et al., 2020). The cauda epididymis was incised with a scalpel, and spermatozoa were pressed into an Eppendorf tube.

Every sperm sample was subjected to a standard evaluation. Sperm concentration was determined using a Bürker counting chamber (Equimed-Medical Instruments, Cracow, Poland) under a light microscope (Olympus BX41TF, Tokyo, Japan). Fresh samples were extended with 0.85% NaCl solution (1:800) before the determination of sperm concentration (Dziekońska et al., 2020). Sperm motility was assessed subjectively in each fresh sample.

2.2. Sperm storage

Sperm were stored in a liquid state (variant I, LS) and in the epididymides (variant II, E). Following a standard analysis of fresh sperm, the samples were divided into two parts and diluted (100×10^6 spermatozoa/mL) in Bovidyl® commercial extender (Minitub GmbH, Tiefenbach, Germany) and Salomon's extender (Tris (0.22 M), citric acid (0.07 M), fructose (0.05 M), and clarified egg yolk (20% v/v)) (Fernández-Santos et al., 2006b). The experimental design is presented in Fig. 1.

2.2.1. Storage of spermatozoa in a liquid state (LS)

Epididymal spermatozoa intended for storage in a liquid state were collected from one epididymis from each individual ($n = 36$). The diluted sperm samples were first incubated for two hours at room temperature. After incubation, samples were stored in a refrigerator (at 5 °C) for 144 h.

2.2.2. Storage of spermatozoa in the epididymis (E)

The second testicle with the epididymis was stored in the scrotal sac. Testicles were divided into three groups and stored in the refrigerator for 48 h ($n = 12$), 96 h ($n = 12$), and 144 h ($n = 12$). Sperm samples were then collected and prepared as described above.

2.3. Assessment of epididymal sperm quality

The biological properties of spermatozoa were assessed in extended sperm samples after equilibration (0 h) and after 48, 96 and 144 h of storage.

2.3.1. Analysis of sperm motility and motility parameters

Before analysis, each sperm sample was diluted 1:4 in Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) to a concentration of 20–30 $\times 10^6$ spermatozoa/mL (Martínez et al., 2008). Diluted samples were heated in a block thermostat (Thermo Block TDR-120, Göttingen, Germany) at a temperature of 37 °C for 5 min. 5 μL aliquots of each sperm sample were placed in a Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) heated to 37 °C. Sperm samples were evaluated in the CASA system and the Hamilton Thorne IVOS v. 12.3 sperm analyzer (Hamilton Thorne Bioscience, Beverley, MA, USA) (Dziekońska et al., 2020). Approximately 1000 spermatozoa were examined in two technical replicates. The evaluation involved software settings that were recommended by the manufacturer for analyses of gazelle/deer sperm: frame acquired - 60, frame rate – 60 Hz, minimum cell contrast - 60, minimum cell size - 5 pixels, straightness threshold - 80%, low VAP cut-off – 21.9 μm/s, low VSL cut-off - 6 μm/s. The following parameters were analyzed: total motility (TMOT, %), progressive motility (PMOT, progressive motile spermatozoa were defined as cells with VAP > 75 μm/s, STR > 80%), average path velocity (VAP, μm/s), straight-line velocity (VSL, μm/s), curvilinear velocity (VCL, μm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, ratio VSL/VAP, %), and linearity coefficient (LIN, ratio VSL/VCL, %).

2.3.2. Plasma membrane integrity

Plasma membrane integrity was assessed using SYBR-14 and propidium iodide (PI) fluorescent staining (Live/Dead Sperm Viability Kit, Cat. No. L7011, Invitrogen, Eugene, OR, USA) according to a procedure described previously by Dziekońska et al. (2020). 20 μL of each stored sample (100×10^6 spermatozoa/mL) was diluted in 180 μL of DPBS. Next, 2 μL of 1 mM SYBR-14 stock solution in HEPES-BSA buffer (130 mM of NaC, 4 mM of KCl, 14 mM of fructose, 10 mM of HEPES, 1 mM of CaCl, 0.5 mM of MgCl, 0.1% BSA, pH 7.4) and 2 μL of PI (2.4 mM in Tyrone's solution) were added, and the samples were incubated at 37 °C for 10 min (Thermo Block

TDR-120). Stained sperm samples were analyzed under a fluorescence microscope (Olympus BX 41, Tokyo, Japan) at 600 × magnification. At least 200 spermatozoa were evaluated in each sample. Spermatozoa with green fluorescence in the head were regarded as viable sperm cells with intact plasma membranes, whereas spermatozoa with red fluorescence in the head were considered necrotic.

2.3.3. Mitochondrial activity

Sperm mitochondrial activity (mitochondrial membrane potential; MMP) was assessed using JC-1 fluorochromes and PI (JC-1, Cat. No. T4069, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) according to a previously described method (Dziekońska et al., 2022b). In brief, sperm samples (20 μL, 100 × 10^6 spermatozoa/mL) were diluted in 180 μL of DPBS and incubated with 1 μL of JC-1 solution (1 mg of JC-1/mL of anhydrous dimethyl sulfoxide, DMSO) at 37 °C for 15 min. Spermatozoa were assessed under a fluorescence microscope (Olympus BX 41, Tokyo, Japan) at 600 × magnification. At least 200 spermatozoa were evaluated in each sample. Spermatozoa exhibiting orange fluorescence in the mid-piece region were regarded as viable cells with a high MMP (active mitochondria, JC-1^+/PI^-), whereas spermatozoa with green fluorescence in the mid-piece region and red fluorescence in the head were classified as moribund cells with a low MMP.

2.3.4. Acrosomal membrane integrity

Acrosomal membrane integrity was evaluated by the fluorescence method using FITC-labeled peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin (FITC-PNA, Cat. No. L7381, Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA) and the method described by Lange-Consiglio et al. (2013), with some modifications (Dziekońska et al., 2020). In brief, 20 μL of each sperm sample (100 × 10^6 spermatozoa/mL) was diluted in 180 μL of DPBS with the addition of 1 μL of JC-1. The samples were incubated at 37 °C for 15 min. The samples were then combined with 2 μL of FITC-PNA solution (1 mg of FITC-PNA/mL of PBS) and 2 μL of PI, and incubated at 37 °C for 5 min. Towards the end of incubation, 10 μL of 10% formalin solution was added to preserve the spermatozoa. At least 200 spermatozoa in randomly selected fields of view were assessed under a fluorescence microscope (Olympus BX 41, Tokyo, Japan). Four sperm subpopulations were identified in the analysis (Dziekońska et al., 2022b). The results were expressed as the percentage of spermatozoa with intact acrosomal membranes (FITC-PNA^-/PI^-).

2.3.5. Analysis of apoptotic-like changes and sperm viability

Sperm viability and apoptotic changes were assessed with the Vybrant Apoptosis Assay Kit # 4 (Cat. No. V13243, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) based on the method described by Dziekońska et al. (2022a). To visualize the spermatozoa, 1 μL of JC-1 was added to 20 μL of sperm samples (previously diluted in 180 μL of DPBS), and the samples were incubated at 37 °C for 10 min. In the next step, 2 μL of YO-PRO-1 solution and 2 μL of PI solution were added, and the samples were incubated at 37 °C for 5 min. A minimum of 200 sperm cells were analyzed under a fluorescence microscope (Olympus BX 41, Tokyo, Japan) at 600 × magnification. Four sperm subpopulations were identified: unstained spermatozoa (YO-PRO-1^-/PI^-) classified as viable cells without apoptotic-like changes, spermatozoa with green heads (YO-PRO-1^+/PI^-) classified as viable cells with apoptotic-like changes, spermatozoa with red heads (YO-PRO-1^+/PI^+) classified as moribund, and spermatozoa with red heads (YO-PRO-1^-/ PI^+) classified as necrotic (non-viable).

2.3.6. DNA integrity

DNA integrity was evaluated according to the method described by Partyka et al. (2017). 200 μL of lysing buffer (0.1%, v/v; Triton X-100, 0.15 M of NaCl, 0.08 M of HCl, pH 1.4) was added to each sperm sample of 50 μL. The samples were left in the dark, at room temperature, for 30 s. Then, 600 μL of acridine orange (AO, Cat. No. A6014, Sigma-Aldrich, Saint Luis, Missouri, USA) solution (6 μg of AO/mL of buffer: 0.1 M of citric acid, 0.2 M of Na_2HPO_4, 1 mM of EDTA, 0.15 M of NaCl, pH 6) was added, and the samples were left in the dark for 3 min. A minimum of 200 spermatozoa were evaluated under a fluorescence microscope (Olympus BX 41, Tokyo, Japan) at 600 × magnification. Spermatozoa with green fluorescence in the head were regarded as cells with intact DNA, whereas spermatozoa with orange or red fluorescence in the head were regarded as cells with damaged DNA (Dziekońska et al., 2023).

2.4. Statistical analysis

The results were processed with the use of the general linear model (GLM) in Statistica v. 12.5 (StatSoft Incorporation, Tulsa OK, USA). The Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of data distribution. The homogeneity of variances was assessed with Levene's test. Parametric data following normality and homogeneity assumptions tests were compared with ANOVA. Non-parametric data were tested with Kruskal-Wallis and Dunn's tests. All results were expressed as the mean ± SEM. Significant main effects were compared using the Bonferroni post hoc test at $P \leq 0.05$. Significant correlations between selected variables in each storage variant, including storage time (144 h) and the applied extender, were determined by calculating Spearman's rank correlation coefficients.

3. Results

3.1. The effect of two storage variants on sperm motility and motility parameters

Spermatozoa stored in LS were characterized by higher motility and motility parameters than those stored in E, regardless of the applied extender (Fig. 2). Yet, in spermatozoa extended with Bovidyl®, significant ($P \leq 0.05$) differences in the values of PMOT (Fig. 2b), VAP (Fig. 2c), VSL (Fig. 2d), BCF (Fig. 2g), STR (Fig. 2h), and LIN (Fig. 2i) were observed between the compared variants

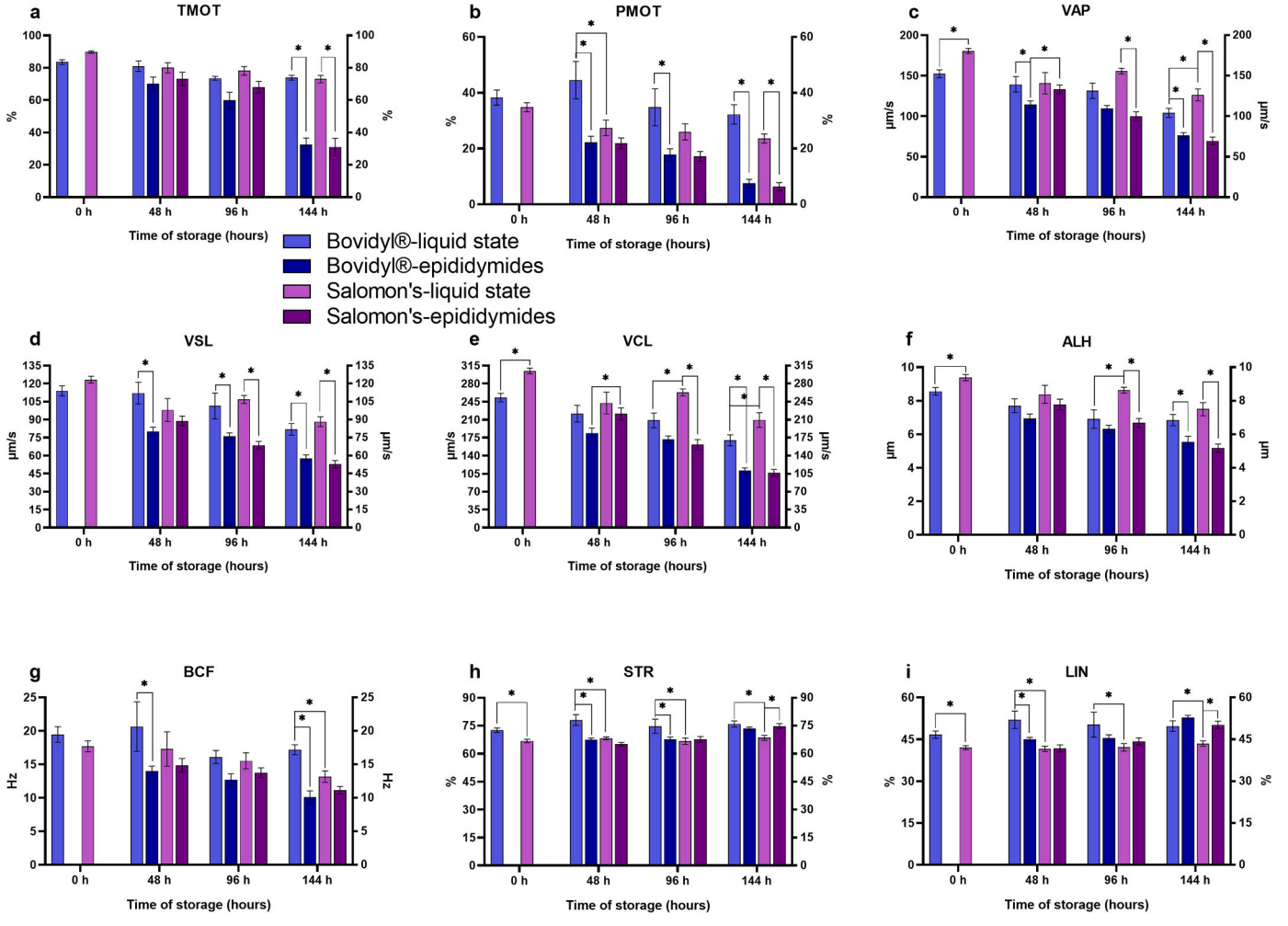


Fig. 2. Motility and motility parameters of spermatozoa stored in the epididymis and in a liquid state at 5 °C ($n = 36$). a – TMOT, total motility; b - PMOT, progressive motility; c - VAP, average path velocity; d - VSL, straight-line velocity; e - VCL, curvilinear velocity; f - ALH, amplitude of lateral head displacement; g - BCF, beat cross frequency; h - STR, straightness; i - LIN, linearity coefficient. The mean (± SEM) values of stored epididymal spermatozoa are presented. * Significant at $P \leq 0.05$.

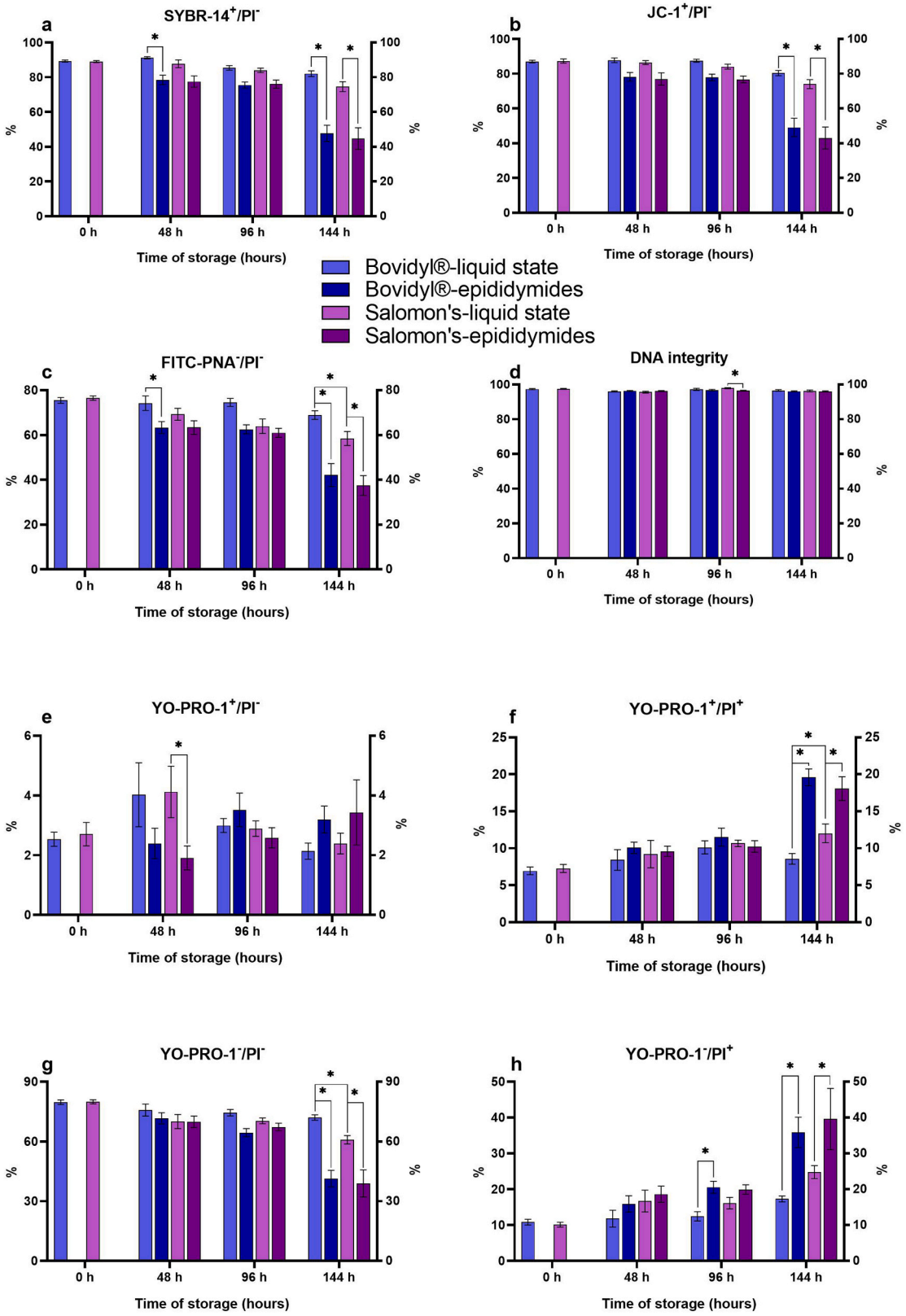


Fig. 3. Plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, acrosomal membrane integrity, DNA integrity, and apoptotic like-changes in spermatozoa stored in the epididymis and in a liquid state at 5 °C ($n = 36$). a - SYBR-14^{+}/PI^{-}, sperm with an intact plasma membrane; b - JC-1^{+}/

PI^-, mitochondrial membrane potential; c - FITC-PNA^-/PI^-, sperm with an intact acrosomal membrane; d - DNA integrity; e - YO-PRO-$1^+/PI^-$ - viable spermatozoa with apoptotic-like changes; f - YO-PRO-$1^+/PI^+$ - moribund spermatozoa; g – YO-PRO-$1^-/PI^-$ - viable spermatozoa without apoptotic-like changes; h - YO-PRO-$1^-/PI^+$ - necrotic spermatozoa. The mean (± SEM) values of stored epididymal sperm are presented. * Significant at $P \leq 0.05$.

after 48 h of storage. In spermatozoa diluted in Salomon's extender, differences in the values of VAP, VSL, VCL (Fig. 2e), and ALH (Fig. 2f) were noted only after 96 h of storage. Changes in the percentage of motile spermatozoa (TMOT) were observed only after 144 h of storage, regardless of the applied extender. Similar differences were noted in the values of PMOT, VAP, VSL, VCL, and ALH. After 144 h of storage, TMOT decreased below 50% of baseline values in spermatozoa stored in E, but remained above 70% of baseline values in spermatozoa stored in LS.

The applied extender also induced differences in the PMOT values and motility parameters of spermatozoa stored in LS, depending on storage time. At 48 h, PMOT, STR, and LIN values were higher ($P \leq 0.05$) in spermatozoa stored in Bovidyl® than in Salomon's extender. In turn, on the first day of storage, VAP, VCL, and AHL values were higher ($P \leq 0.05$) in spermatozoa stored in Salomon's extender than in Bovidyl®. Similar observations were made on successive days in spermatozoa stored in LS. In spermatozoa stored in E, the applied extender had no significant effect on the analyzed motility parameters, excluding VCL and VAP at 48 h.

3.2. The effect of two storage variants on sperm viability, acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity, DNA integrity, and apoptotic-like changes in sperm

Regardless of storage time and the applied extender, a greater decrease in the percentage of sperm with an intact plasma membrane (Fig. 3a), mitochondrial activity (Fig. 3b), and sperm with intact acrosomes (Fig. 3c) was observed during storage in E compared with storage in LS. Significant differences between storage variants were observed only after 144 h, irrespective of the extender. After 144 h, the analyzed parameters decreased to around 40% of baseline values in the spermatozoa stored in E, but were determined at 60% or more of baseline values in the spermatozoa stored in LS. In spermatozoa stored in Bovidyl®, differences ($P \leq 0.05$) in plasma and acrosomal membrane integrity were noted already after 48 h of storage. In the analysis of DNA integrity (Fig. 3d), significant differences between E and LS were noted only at 96 h in spermatozoa stored in Salomon's extender. Yet, the percentage of spermatozoa with intact DNA exceeded 95.5% and remained fairly stable in the compared variants, regardless of storage time. The percentage of viable spermatozoa with apoptotic-like changes differed ($P \leq 0.05$) between storage variants at 48 h, but only in the samples preserved in Salomon's extender (Fig. 3e). Yet, at 48 h, the percentage of viable spermatozoa with apoptotic-like changes was much higher in the samples stored in LS than in those stored E, regardless of the applied extender. After 96 h of storage, the percentage of viable spermatozoa with apoptotic-like changes increased in the samples stored in E relative to those stored in LS. After 144 h of storage, the percentage of moribund spermatozoa increased significantly ($P \leq 0.05$) in the samples stored in E (more than 18%), compared with those stored in LS (approx. 10%), regardless of the applied extender (Fig. 3f). At 144 h, significant differences in the percentage of normal spermatozoa and necrotic spermatozoa were also observed between the compared variants, irrespective of the applied extender (Figs. 3g and 3h, respectively). The percentage of necrotic spermatozoa also differed significantly between E and LS after 96 h of storage in Bovidyl®.

3.3. Correlations between the analyzed sperm parameters in two storage variants

Correlations ($P \leq 0.05$) were observed between selected sperm quality parameters, taking into account the storage method and a storage time of 144 h, for which the highest number of differences were noted between the compared variants.

At 144 h, the percentage of motile sperm (TMOT) and progressively motile sperm (PMOT) was positively correlated with the plasma membrane integrity of sperm during storage in LS ($P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively, Table 1). Progressive motility was also positively correlated with sperm with an intact acrosomal membrane (FITC-PNA^-/PI^-). In turn, sperm with an intact acrosomal membrane was bound by a strong positive correlation with mitochondrial activity (JC-$1^+/PI^-$) ($P \leq 0.001$) and the percentage of viable spermatozoa without apoptotic-like changes (YO-PRO-$1^-/PI^-$) ($P \leq 0.001$), and by a negative correlation with the percentage of moribund spermatozoa (YO-PRO-$1^+/PI^+$) ($P \leq 0.01$) and the percentage of necrotic spermatozoa (YO-PRO-$1^-/PI^+$) ($P \leq 0.001$). Strong positive correlations ($P \leq 0.01$ or $P \leq 0.001$) were also noted between plasma membrane integrity, mitochondrial activity, acrosomal membrane integrity, and the percentage of viable spermatozoa without apoptotic-like changes.

Similar correlations were found in spermatozoa stored in E for 144 h (Table 2). Total motility was highly positively correlated with PMOT ($P \leq 0.001$). In turn, PMOT was bound by a strong positive correlation with SYBR-$14^+/PI^-$, mitochondrial activity, acrosomal membrane integrity, and the percentage of viable spermatozoa without apoptotic-like changes ($P \leq 0.001$). Negative correlations were noted between PMOT and the percentage of viable spermatozoa with apoptotic-like changes ($P \leq 0.05$), and between TMOT and PMOT vs. YO-PRO-$1^-/PI^+$ ($P \leq 0.001$). Significant positive correlations ($P \leq 0.001$) were also observed between plasma membrane integrity, mitochondrial activity, acrosomal membrane integrity, and the percentage of viable spermatozoa without apoptotic-like changes. These parameters were negatively correlated with the percentage of necrotic spermatozoa ($P \leq 0.001$). The percentage of sperm with intact DNA was negatively correlated with the percentage of viable spermatozoa without apoptotic-like changes ($P \leq 0.01$) and the percentage of viable spermatozoa with apoptotic-like changes ($P \leq 0.05$).

Table 1
Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer epididymal spermatozoa stored in a liquid state at 5 °C for 144 h ($n = 12$).

	TMOT	PMOT	SYBR-14$^+$/PI$^-$	JC-1$^+$/PI$^-$	FITC-PNA$^-$/PI$^-$	DNA integrity	YO-PRO-1$^-$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^+$	YO-PRO-1$^-$/PI$^+$
TMOT	1	0.470 *	0.609 * *	0.327	0.225	0.058	0.227	0.166	-0.114	-0.226
PMOT		1	0.427 *	0.284	0.491 *	0.198	0.402	0.078	-0.426	-0.312
SYBR-14$^+$/PI$^-$			1	0.747 * **	0.605 * *	0.172	0.699 * **	-0.006	-0.546 * *	-0.577 * *
JC-1$^+$/PI$^-$				1	0.658 * **	-0.081	0.755 * **	-0.142	-0.569 * *	-0.673 * **
FITC-PNA$^-$/PI$^-$					1	0.244	0.739 * **	-0.227	-0.508 *	-0.721 * **
DNA integrity						1	-0.011	0.044	-0.007	0.075
YO-PRO-1$^-$/PI$^-$							1	-0.265	-0.745 * **	-0.902 * **
YO-PRO-1$^+$/PI$^-$								1	0.415 *	0.052
YO-PRO-1$^+$/PI$^+$									1	0.458 *
YO-PRO-1$^-$/PI$^+$										1

* Significant at $P \leq 0.05$; ** Significant at $P \leq 0.01$; *** Significant at $P \leq 0.001$; TMOT, total motility (%); PMOT, progressive motility (%); SYBR-14$^+$/PI$^-$, sperm with an intact plasma membrane (%); JC-1$^+$/PI$^-$, mitochondrial membrane potential (%); FITC-PNA$^-$/PI$^-$, sperm with an intact acrosomal membrane integrity (%); sperm with an intact DNA (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^-$, viable spermatozoa without apoptotic-like changes (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^-$, viable spermatozoa with apoptotic-like changes (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^+$, moribund spermatozoa (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^+$, necrotic spermatozoa (%).

Table 2
Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer spermatozoa stored in the epididymis at 5 °C for 144 h ($n = 12$).

	TMOT	PMOT	SYBR-14$^+$/PI$^-$	JC-1$^+$/PI$^-$	FITC-PNA$^-$/PI$^-$	DNA integrity	YO-PRO-1$^-$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^-$	YO-PRO-1$^+$/PI$^+$	YO-PRO-1$^-$/PI$^+$
TMOT	1	0.884 * **	0.880 * **	0.723 * **	0.821 * **	-0.395	0.813 * **	0.390	0.330	-0.807 * **
PMOT		1	0.812 * **	0.700 * **	0.744 * **	-0.410	0.760 * **	0.537 *	0.358	-0.764 * **
SYBR-14$^+$/PI$^-$			1	0.883 * **	0.917 * **	-0.395	0.893 * **	0.300	0.227	-0.842 * **
JC-1$^+$/PI$^-$				1	0.850 * **	-0.302	0.743 * **	0.294	0.168	-0.696 * **
FITC-PNA$^-$/PI$^-$					1	-0.479 *	0.902 * **	0.268	0.177	-0.854 * **
DNA integrity						1	-0.577 * *	-0.508 *	-0.244	0.594 * *
YO-PRO-1$^-$/PI$^-$							1	0.343	0.158	-0.952 * **
YO-PRO-1$^+$/PI$^-$								1	0.641 * *	-0.495 *
YO-PRO-1$^+$/PI$^+$									1	-0.362
YO-PRO-1$^-$/PI$^+$										1

* Significant at $P \leq 0.05$; ** Significant at $P \leq 0.01$; *** Significant at $P \leq 0.001$; TMOT, total motility (%); PMOT, progressive motility (%); SYBR-14$^+$/PI$^-$, sperm with an intact plasma membrane (%); JC-1$^+$/PI$^-$, mitochondrial membrane potential (%); FITC-PNA$^-$/PI$^-$, sperm with intact acrosomal membrane (%); sperm with an intact DNA (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^-$, viable spermatozoa without apoptotic-like changes (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^-$, viable spermatozoa with apoptotic-like changes (%); YO-PRO-1$^+$/PI$^+$, moribund spermatozoa (%); YO-PRO-1$^-$/PI$^+$, necrotic spermatozoa (%).

4. Discussion

Spermatozoa stored in the epididymides harvested post-mortem from culled animals can contribute to the preservation of genetic material from individuals with superior traits and the protection of valuable animal species, including cervids. The European red deer is the most commonly farmed cervid species (Bombik and Kondracki, 2007), and inbreeding poses a considerable problem in small cervid farms. The risk of inbreeding can be minimized by using spermatozoa from free-living deer for reproductive purposes. Still, the access to fresh epididymal sperm from hunter-harvested animals is limited because hunting grounds are usually located remotely from laboratories. A knowledge of the biological parameters of spermatozoa stored for more than 10 h in the epididymides of free-living European red deer can have significant implications for breeding practice.

Previous studies on cervids, mostly those conducted on Iberian red deer, have demonstrated that the motility and membrane integrity of spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state for up to 192 h were preserved to a similar extent for up to 96 h (Soler et al., 2005; Fernández-Santos et al., 2009). European red deer spermatozoa can be stored in a liquid state for a much longer (Dziekońska et al., 2020, 2022b), but the biological properties of spermatozoa stored in the epididymides have not been examined to date.

To fill this knowledge gap, the present study was undertaken to compare the biological properties and fertilizing capacity of European red deer spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state. In both variants, spermatozoa were stored at a temperature of 5 °C for 144 h. This temperature is recommended for storing the sperm of ruminants, including cervids (Asher et al., 2000; Soler et al., 2003, 2005; Fernández-Santos et al., 2006b). The same extenders were applied in the compared storage variants. These extenders had been previously used to preserve cervid sperm (Fernández-Santos et al., 2006b, 2009; Dziekońska et al., 2020, 2022a, b). Sperm motility and motility parameters, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity, DNA integrity, and apoptotic-like changes were analyzed in different hours of storage. These parameters determine the suitability of sperm cells for assisted reproduction technologies (Moce and Graham, 2008).

Sperm motility and motility parameters are the key criteria for evaluating the quality and fertilizing capacity of spermatozoa (Dott and Foster, 1979; Malo et al., 2005; Martínez et al., 2006). An analysis of the percentage of progressively moving spermatozoa and motility parameters revealed that the spermatozoa stored in a liquid state were characterized by significantly higher values of all analyzed parameters (VAP, VSL, VCL, STR, LIN) from the 48th hour onward compared with those stored in the epididymides. This observation indicates that the motility parameters of sperm cells stored in the epididymides deteriorate more rapidly. The results of this study could suggest that spermatozoa stored in a liquid state are better suited for reproductive purposes. The obtained motility results suggest that sperm stored in the epididymides for up to 96 h could also be used for reproductive purposes. This method of storage could offer a viable solution for collecting valuable genetic material from free-living cervids when the samples cannot be quickly delivered to the laboratory. The differences in sperm motility observed within storage variants could be attributed to differences in the composition of the tested extenders. In addition to the ingredients present in Salomon's extender (citrate, TRIS, chicken egg yolk), Bovidyl® also contains bovine albumin and antioxidants. These compounds exert protective effects on plasma and acrosomal membranes (Plante et al., 2016; Castellini et al., 2021), and they can potentially stimulate sperm motility (Tsutsui et al., 2003; Akhter et al., 2014). Egg yolk, due to its biochemical properties, helps protect cell membranes and the acrosome of sperm against damage caused by cold shock (Fernández-Santos, et al., 2006b). In the present study, the analysis of sperm movement revealed hyperactivated sperm whose movement was similar to that used in a hyperactivation model (Suarez and Ho, 2003). The above could be related to the influx of calcium from the extracellular space or the increase in intracellular pH during capacitation (Hinrichs and Loux, 2012). The use of an appropriate medium with the addition of Tris could contribute to an increase in ALH values (Yániz et al., 2010) as well as hyperactivated motility observed in this study. Sperm motility is influenced by the functionality of cell structures, which was confirmed by the analysis of plasma and acrosomal membrane integrity, and mitochondrial activity. In spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides, the functionality of the examined structures was preserved to a similar extent up to 96 h, excluding the samples stored in Bovidyl®, where the percentage of sperm cells with intact plasma and acrosomal membranes was higher at 48 h. As previously mentioned, these differences could be attributed to the presence of albumin and antioxidants in Bovidyl®. Interestingly, the differences induced by the applied extender decreased gradually on successive days of the experiment. The percentage of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membranes and active mitochondria decreased gradually up to 96 h of storage, which was also observed in previous studies (Soler et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2005a; Dziekońska et al., 2022a, b). Yet, the percentage of spermatozoa with active mitochondria was somewhat higher than that reported in a study of the Iberian red deer, which could also be attributed to differences in the applied fluorescence methods (microscopic analysis vs. flow cytometry) (Dziekońska et al., 2023).

Mitochondrial activity and intact plasma membranes are vital for maintaining sperm motility, including progressive motility (Volpe et al., 2009; Del Prete et al., 2022), hyperactivation, capacitation, acrosin activity, acrosome reaction, and DNA integrity (Marchetti et al., 2004; Herst et al., 2017; Barbagallo et al., 2020; Durairajanayagam et al., 2021). In the present study, a decrease in mitochondrial activity during storage was accompanied by changes in sperm motility, and plasma and acrosomal membrane integrity. The decrease in mitochondrial activity during storage was also related to an increase in the percentage of viable spermatozoa with apoptotic-like changes and necrotic spermatozoa, which was also observed in previous studies (Martínez-Pastor et al., 2008; Trzcińska et al., 2011; Dziekońska et al., 2022b). Apoptotic-like changes are induced by mitochondrial dysfunction which leads to the overproduction of reactive oxygen species (ROS), loss of mitochondrial membrane potential, caspase activation, exposure to phosphatidylserine, and oxidative DNA damage (Shukla et al., 2012; Aitken et al., 2016; Castellini et al., 2021). These changes could be responsible for the progressive decline in the biological properties of stored spermatozoa. In both storage variants, significant correlations were found between the functionality of the examined cell structures, and between functionality and sperm motility. Significant correlations between the analyzed structures were also noted in different hours of storage (data not presented).

DNA integrity can influence the fertilizing capacity of spermatozoa, and the DNA integrity test is often recommended to evaluate sperm quality and suitability for reproductive purposes. Defects in sperm chromatin compromise embryonic and fetal development (Larson-Cook et al., 2003; Sadeghi et al., 2009). In this study, significant differences in the percentage of sperm with intact DNA were not observed, regardless of the storage variant and storage time, excluding the samples stored in Salomon's extender for 96 h. These results suggest that DNA structure remains fairly stable up to 144 h in spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state. Similar observations were made in previous studies (Soler et al., 2005; Dziekońska et al., 2022a, b), although other authors reported a considerable decline in sperm with intact DNA, in particular in spermatozoa stored in the epididymides (Fernández-Santos et al., 2009). DNA integrity could also be influenced by other factors, including the sensitivity of the analytical method (Muratori et al., 2008; Dziekońska et al., 2023). Various methods are currently being used to analyze the degree of DNA damage. These include the comet assay, the sperm chromatin structure assay (SCSA), the sperm chromatin dispersion test (SCDt), and the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end (TUNEL) assay, and these approaches are more recommended than the acridine orange (AO) test (Maside et al., 2023; Shamsi et al., 2011). Unlike other methods, the AO test provides only an approximation of DNA damage; therefore, it may not detect significant differences between storage variants.

In the current study, differences in the biological properties of European red deer spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state were observed much earlier than in a study of Iberian red deer spermatozoa (Fernández-Santos et al., 2009). In this experiment, the epididymides were stored in the scrotum throughout the entire experiment, whereas in the cited study, the epididymides were prepared, placed in plastic bags, and stored in containers filled with water. Therefore, the applied storage method could also be responsible for the earlier decline in the biological parameters of spermatozoa stored in the epididymides than in a liquid state, but further research is needed to validate this observation. Nonetheless, the present findings indicate that European red deer spermatozoa stored in the epididymides at a temperature of 5 °C for up to 96 h can be potentially used for reproductive purposes.

5. Conclusion

The analysis of the biological properties of European red deer epididymal spermatozoa (total motility, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial function, and apoptotic-like changes) demonstrated that sperm cells can be stored in the epididymides in the scrotal sac at a temperature of 5 °C for up to 96 h. Yet, the motility parameters of spermatozoa stored in the epididymides decline more rapidly (after 48 h), depending on the applied extender. The biological properties of sperm cells are more effectively preserved during liquid storage, and this method is recommended for short-term preservation of spermatozoa.

CRediT authorship contribution statement

N.M.N.: Conceptualization, Experimental design, Sperm quality analysis, Writing the original draft; A.D.: Research concept, Experimental design, Writing, Reviewing, and editing the manuscript; A.O.: Sperm quality analysis; P.G.: Review. All authors have contributed to the article and have approved the submitted manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank all employees of Nowe Ramuki Forest Inspectorate, especially K. Zdun, M. Zega, G. Wiciel, and T. Dzietowiecki, and the hunters who helped with sample collection. The samples were obtained under a scientific cooperation agreement concluded by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn and Nowe Ramuki Forest Inspectorate.

Financial support statement

The study was supported by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Project No. 11.610.003–110. Project financially supported by Minister of Education and Science in the range of the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2023, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN.

References

Abella, D.F., Da Costa, M., Guérin, Y., Dacheux, J.L., 2015. Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4 °C. Animal 9, 313–319. https://doi.org/10.1017/S1751731114002109.

Aitken, R.J., Gibb, Z., Bakeer, M.A., Drevet, J., Gharagozloo, P., 2016. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev. 28, 1–10. https://doi.org/10.1071/rd15325.

Akhter, S., Rakha, B.A., Iqbal, R., Ansari, M.S., 2014. Effect of Bovine Serum Albumin on Motility, Plasmalemma, Viability and Chromatin Integrity of Buffalo Bull Spermatozoa. Pakistan. J. Zool. 46, 115–120.

Asher, G.W., Berg, D.K., Evans, G., 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer, 195–121 Anim. Reprod. Sci. 62. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00159-7.

Barbagallo, F., La Vignera, S., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, A.E., Condorelli, R.A., 2020. Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility. J. Clin. Med. 9, 363. https://doi.org/10.3390/jcm9020363.

Bombik, S., Kondracki, S., 2007. Znaczenie hodowli zwierząt wolno żyjących (cz. II). Prz. Hod. 2, 25–29.

Castellini, C., D'Andrea, S., Cordeschi, G., Totaro, M., Parisi, A., Di Emidio, G., Tatone, C., Francavilla, S., Barbonetti, A., 2021. Pathophysiology of mitochondrial dysfunction in human spermatozoa: focus on energetic metabolism, oxidative stress and apoptosis. Antioxidants 10, 695. https://doi.org/10.3390/antiox10050695.

Comizzoli, P., Mermillod, P., Cognié, Y., Chai, N., Legendre, X., Mauget, R., 2001. Successful in vitro production of embryos in the red deer (Cervus elaphus) and the sika deer (Cervus nippon). Theriogenology 55, 649–659. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00433-2.

Del Prete, C., Prieto, O.B., Mislei, B., Iacono, E., Mari, G., Cocchia, N., Gasparrini, B., Merlo, B., Bucci, D., 2022. Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. Anim. Reprod. Sci. 247, 107089 https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107089.

Dott, H.M., Foster, G.C.A., 1979. The estimation of sperm motility in semen on membrane slide by measuring the area change frequency with inn image analysing computer. J. Reprod. Fertil. 55, 161–166. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0550161.

Durairajanayagam, D., Singh, D., Agarwal, A., Henkel, R., 2021. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. Andrologia 53, e13666. https://doi.org/10.1111/and.13666.

Dziekońska, A., Niedźwiecka, E., Niklewska, M.E., Koziorowska-Gilun, M., Kordan, W., 2020. Viability longevity and quality of epididymal sperm stored in the liquid state of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). Anim. Reprod. Sci. 213, 106269 https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106269.

Dziekońska, A., Koziorowska-Gilun, M., Kordan, W., Neuman, N.M., Kotlarczyk, A.M., Korzekwa, A.J., 2022a. The Quality and Fertilizing Potential of Red Deer (*Cervus elaphus* L.) Epididymal Spermatozoa Stored in a Liquid State. Int. J. Mol. Sci. 23, 14591. https://doi.org/10.3390/ijms232314591.

Dziekońska, A., Neuman, N.M., Burdal, K.K., Wiszniewska-Łaszczych, A., Bogdaszewski, M., 2022b. The effect of different extenders on the quality characteristics of european red deer epididymal sperm stored at 5 °C. Animals 12, 2669. https://doi.org/10.3390/ani12192669.

Dziekońska, A., Lecewicz, M., Partyka, A., Niżański, W., 2023. Fluorescence microscopy and flow-cytometry assessment of substructures in european red deer epididymal spermatozoa after cryopreservation. Animals 13, 990 https:// doi.org/10.3390/ani13060990.

Fernández-Santos, M.R., Esteso, M.C., Montoro, V., Soler, A.J., Garde, J.J., 2006a. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. Theriogenology 66, 1931–1942. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.012.

Fernández-Santos, M.R., Esteso, M.C., Soler, A.J., Montoro, V., Garde, J.J., 2006b. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Reprod. Domest. Anim. 41, 114–118. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00649.x.

Fernández-Santos, M.R., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Esteso, M.C., Soler, A.J., Paz, P., Anel, L., Garde, J.J., 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Theriogenology 67, 738–753. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.10.005.

Fernández-Santos, M.R., Dominguez-Rebolledo, A.E., Esteso, M.C., Garde, J.J., Martínez-Pastor, F., 2009. Refrigerated Storage of Red Deer Epididymal Spermatozoa in the Epididymis, Diluted and with Vitamin C Supplementation. Reprod. Dom. Anim. 44, 212–220. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01032.x.

Garde, J.J., Martínez-Pastor, F., Gomendio, M., Malo, A.F., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Esteso, M.C., García, A.J., Anel, L., Roldán, E.R.S., 2006. The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. Reprod. Domest. Anim. 41, 93–102. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00773.x.

Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., Carluccio, A., 2011. Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. Anim. Reprod. Sci. 128, 117–122. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.09.007.

Herst, P.M., Rowe, M.R., Carson, G.M., Berridge, M.V., 2017. Functional mitochondria in health and disease. Front. Endocrinol. (Lausanne) 8, 296. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00296.

Hinrichs, K., Loux, S.C., 2012. Hyperactivated sperm motility: are equine sperm different? J. Equine Vet. Sci." 32, 441–444. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.070.

Hishinuma, M., Suzuki, K., Sekine, J., 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. Theriogenology 59 (3–4), 813–820. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01154-8.

Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraez, P., Anel, L., 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. Theriogenology 60, 1249–1259. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00139-0.

Kishikawa, H., Tateno, H., Yanagimachi, R., 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 °C. J. Reprod. Fertil, 116, 217–222. https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160217.

Lange-Consiglio, A., Meucci, A., Cremonesi, F., 2013. Fluorescent multiple staining and CASA system to assess boar sperm viability and membranes integrity in short and long-term extenders. Open Vet. J. 3, 21–35.

Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.D., Evenson, D.P., 2003. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. Fertil. Steril. 80, 895–902.

Malo, A.F., Garde, J.J., Soler, A.J., Garcia, A.J., Gomendio, M., 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. Biol. Reprod, 72, 822–829. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.036368.

Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defossez, A., Formstecher, P., Marchetti, P., 2004. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. Hum. Reprod. 19, 2267–2276. https://doi.org/10.1093/humrep/deh416.

Martínez, A.F., Martínez-Pastor, F., Alvarez, M., Fernández-Santos, M.R., Esteso, M.C., de Paz, P., Garde, J.J., Anel, L., 2008. Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collection. Theriogenology 70, 216–226. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.001.

Martínez, I.N., Morán, J.M., Peña, F.J., 2006. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. J. Androl. 27, 596–603. https://doi.org/10.2164/jandrol.05153.

Martinez-Pastor, F., Anel, L., Guerra, C., Alvarez, M., Soler, A.J., Garde, J.J., Chamorro, C., Paz, P., 2006. Seminal plasma improves cryopreservation of iberian red deer epididymal sperm. Theriogenology 66, 1847–1856. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.036.

Martinez-Pastor, F., Diaz-Corujo, A.R., Anel, E., Herraez, P., Anel, L., de Paz, P., 2005a. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. Theriogenology 64, 958–974. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.003.

Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M.R., del Olmo, E., Domínguez-Rebolledo, A.E., Esteso, M.C., Montoro, V., Garde, J.J., 2008. Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. Reprod. Fertil. Dev. 20, 547–556. https://doi.org/10.1071/rd08002.

Martinez-Pastor, F., Guerra, C., Kaabi, M., Diaz, A.R., Anel, E., Herraez, P., de Paz, P., Anel, L., 2005b. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. Theriogenology 63, 24–40. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.003.

Martins, C.F., Driessen, K., Melo Costa, P., Carvalho-Neto, J.O., de Sousa, R.V., Rumpf, R., Dode, M.N., 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. Anim. Reprod. Sci. 116, 50–57. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.12.018.

Maside, C., Recuero, S., Salas-Huetos, A., Ribas-Maynou, J., Yeste, M., 2023. Animal board invited review: an update on the methods for semen quality evaluation in swine – from farm to the lab. Animal 17 (3), 100720. https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100720.

Moce, E., Graham, J.K., 2008. In Vitro evaluation of sperm quality. Anim. Reprod. Sci. 105, 104–118. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.016.

Muratori, M., Forti, G., Baldi, E., 2008. Comparing flow cytometry and fluorescence microscopy for analyzing human sperm DNA fragmentation by TUNEL labeling. Cytom. A 73, 785–787. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20615.

Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J., Nizański, W., 2017. The Effect of L-carnitine, hypotaurine, and taurine supplementation on the quality of cryopreserved chicken semen. Biomed. Res. Int. 2017, 7279341 https://doi.org/10.1155/2017/7279341.

Plante, G., Prud'homme, B., Fan, J., Lafleur, M., Manjunath, P., 2016. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. Cell. Tissue Res. 363, 105–127. https://doi.org/10.1007/s00441-015-2289-2.

Sadeghi, M.R., Hodjat, M., Lakpour, N., Arefi, S., Amirjannati, N., Modarresi, T., Jadda, H.H., Akhondi, M.M., 2009. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. Avicenna J. Med. Biotechnol. 1, 173–180.

Shamsi, M.B., Syed Nazar Imam, S.I., Rima Dada, R., 2011. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. J. Assist Reprod. Genet 28, 1073–1085 https://doi.org/10.1007%2Fs10815-011-9631-8.

Shukla, K.K., Mahdi, A.A., Rajender, S., 2012. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. Front. Biosci. 4, 746–754. https://doi.org/10.2741/415.

Soler, A.J., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J., 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5 degrees C: effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol. 295, 188. https://doi.org/10.1002/jez.a.10194.

Soler, A.J., Esteso, M.C., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J., 2005. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. Theriogenology 64, 1503–1517. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.013.

Songsasen, N., Tong, J., Leibo, S.P., 1998. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. J. Exp. Zool. 280, 189–196 https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19980201)280:2%3C189::aid-jez10%3E3.0.co;2-h.

Suarez, S.S., Ho, H.-C., 2003. Hyperactivated Motility in Sperm. Reprod. Domest. Anim. 38, 119–124. https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00397.x.

Trzcińska, M., Bryła, M., Smorąg, Z., 2011. Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced In Vivo. Anim. Reprod. Sci. 124, 90–97. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.016.

Tsutsui, T., Tezuka, T., Mikasa, Y., Sugisawa, H., Kirihara, N., Hori, T., Kawakami, E., 2003. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. J. Vet. Med. Sci. 65, 307–312.

Volpe, S., Leoci, R., Aiudi, G., Lacalandra, G.M., 2009. Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. Reprod. Domest. Anim. 44, 275–278. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01457.x.

Watson, P.F., Fuller, B.J., 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos. In: Watson, P.F., Holt, W.V. (Eds.), Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future. Taylor & Francis, London, pp. 21–46.

Yániz, J.L., Mateos, J.A., Santolaria, P., 2010. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C Small Rumin. Res 95, 54–60. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.08.006.

Yu, I., Leibo, S.P., 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. Theriogenology 57, 1179–1190. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00711-7.

Olsztyn, 17.06.2025

Nicoletta Magdalena Neuman
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy: **Neuman N.M., Dziekońska A., Orzołek A., Gilun P. 2024, A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5 °C, Animal Reproduction Science, 260, 107387, https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Neuman Nicoletta
(podpis kandydata)

Olsztyn, 17.06.2025

dr hab. Anna Dziekońska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Dziekońska A., Orzołek A., Gilun P. 2024, A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5 °C, Animal Reproduction Science, 260, 107387, https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji badań, pisaniu, recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

A. Dziekońska
.....
podpis/podpisy

Olsztyn, 17.06.2025

dr inż. Aleksandra Orzołek
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Dziekońska A., Orzołek A., Gilun P. 2024, A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5 ˚C, Animal Reproduction Science, 260, 107387, https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Aleksandra Orzołek
podpis/podpisy

Olsztyn, 17.06.2025

dr Przemysław Gilun
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Dziekońska A., Orzołek A., Gilun P. 2024, A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5 °C, Animal Reproduction Science, 260, 107387, https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107387** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: recenzowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Przemysław Gilun

.....
podpis/podpisy

ZAŁĄCZNIK 2

PUBLIKACJA 2 (P2)

Neuman, N. M., Orzołek, A., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Dziekońska, A. (2024). Changes in the morphology and antioxidant status of European red deer sperm stored in the epididymides and in a liquid state. *Animals*, *14*, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653

animals

MDPI

Article

Changes in the Morphology and Antioxidant Status of European Red Deer Sperm Stored in the Epididymides and in a Liquid State

Nicoletta M. Neuman [1], Aleksandra Orzołek [1], Żaneta Steiner-Bogdaszewska [2] and Anna Dziekońska [1,*]

[1] Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Poland; nicoletta.neuman@uwm.edu.pl (N.M.N.); aleksandra.deszczka@uwm.edu.pl (A.O.)

[2] Witold Stefański Institute of Parasitology of the Polish Academy of Sciences, Research Station in Kosewo Górne, 11-700 Mrągowo, Poland; kosewopan@kosewopan.pl

* Correspondence: a.dziekonska@uwm.edu.pl

Simple Summary: The choice of the optimal sperm preservation method is an important consideration in animal breeding. Stored semen can be used for reproductive purposes to introduce new genotypes and prevent inbreeding, which poses a considerable problem in cervid farms. The aim of this study was to evaluate and compare the effect of storage time and storage method (liquid state/epididymides) on the motility, morphology, and antioxidant status of European red deer sperm stored at 5 °C for up to six days (D0-D6). Sperm samples were assessed for motility, viability, morphology, activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx; catalase, CAT), and lipid peroxidation (based on malondialdehyde, MDA, content). Significant differences between storage variants were noted on D2 in sperm morphology; on D4 in the percentage of progressively motile sperm, MDA content, and SOD and GPx activity; and on D6 in the percentage of motile and viable spermatozoa. Sperm motility, viability, and antioxidant status are more effectively preserved during liquid storage than epididymal storage. Morphological and functional abnormalities of sperm were observed earlier during epididymal storage, which suggests that spermatozoa can be stored for shorter periods of time in the epididymides than in a liquid state.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the motility, morphology, and antioxidant status of European red deer sperm stored in a liquid state (variant I) and in the epididymides (variant II). Spermatozoa were harvested post-mortem from the cauda epididymis. Sperm samples in both variants were stored for up to six days (D6) at 5 °C. Spermatozoa were assessed for motility, viability, morphology, activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, SOD; glutathione peroxidase, GPx; catalase, CAT), and lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA, content). Sperm samples were analyzed on storage days 0, 2, 4, and 6 (D0-D6). Storage time and storage method significantly ($p \leq 0.05$) influenced the examined variables. On D2, a decrease in motility and acrosomal integrity was observed in both storage variants, whereas a decrease in viability and an increase in MDA content were noted in spermatozoa stored in the epididymides. On D4, higher values of SOD and GPx activity and MDA content were noted in variant I than in variant II. Catalase activity was very low. GPx is the key enzyme that participates in the reduction of hydrogen peroxide in sperm cells. Spermatozoa stored in a liquid state were characterized by higher motility and viability, improved morphology and antioxidant status than those stored in the epididymides; therefore, liquid storage is more recommended for short-term preservation of epididymal spermatozoa.

Keywords: epididymal sperm; morphology; antioxidant status; storage; European red deer

check for updates

Citation: Neuman, N.M.; Orzołek, A.; Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Dziekońska, A. Changes in the Morphology and Antioxidant Status of European Red Deer Sperm Stored in the Epididymides and in a Liquid State. *Animals* **2024**, *14*, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653

Academic Editor: Eva Bussalleu

Received: 29 April 2024
Revised: 25 May 2024
Accepted: 29 May 2024
Published: 31 May 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The knowledge about the semen of free-living animals and effective semen preservation methods is limited and should be expanded. The existing sperm storage methods have been developed based on our knowledge of livestock species. Deer sperm is preserved mostly with the use of methods designed for domesticated ruminants [1], and ejaculated semen is recommended for preservation. However, semen samples are difficult to obtain from cervids due to their unique behavior, and sperm is often collected post-mortem from the epididymides [2,3]. The epididymal sperm of cervids, similarly to ejaculated sperm, can be stored in a liquid state [4–6], in a frozen state [7,8], and in the epididymides [9,10]. Of these methods, cryopreservation is the most commonly used. However, it is not always recommended for economic and practical reasons. Moreover, the fertilizing capacity of cryopreserved sperm is reduced, compared with fresh sperm and sperm stored for a short period of time in a liquid state [1]. For this reason, short-term sperm storage may be a better method to protect sperm quality than cryopreservation. Epididymal sperm harvested from deer in their natural environment is a source of valuable genetic material for reproductive purposes [11,12]. Their use in assisted reproduction techniques can reduce the phenomenon of inbreeding in limited-population deer farms and contribute to significant breeding progress [2]. However, spermatozoa cannot always be collected from hunter-harvested animals directly after culling, and in some cases, sperm is stored in the epididymides for many hours. Previous studies have shown that prolonged storage in the epididymides can adversely affect sperm functions and their suitability for reproduction [9,13].

The quality of stored spermatozoa can be undermined by various factors, including oxidative stress. Oxidative stress increases lipid peroxidation and disrupts the activity of antioxidant enzymes [14,15]. Oxidative stress also causes oxidative damage to cell organelles and increases the production of reactive oxygen species (ROS) [14,16,17]. Spermatozoa stored at low temperatures are exposed to cold shock. Cold shock enhances ROS production in sperm cells and increases their susceptibility to lipid peroxidation [18].

In healthy organisms, antioxidant defense systems offer protection against the harmful effects of ROS [19,20]. The key antioxidant enzymes include superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT) [16,17,19,21]. Sperm cells rely on the antioxidant enzymes in the epididymides and their own antioxidant capacity to mitigate the harmful consequences of ROS during transport through the epididymides, storage, and fertilization [22].

Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant status during storage can affect sperm viability, morphology, and motility [23,24]. Sperm morphology is an important consideration during sperm assessment [25]. Spermatozoa with a normal morphology have a higher fertilization potential [26]. Morphological defects, in particular, head defects, significantly undermine sperm's ability to fuse with an egg cell [25]. Changes in the morphology and antioxidant status of stored cervid epididymal spermatozoa have not been analyzed to date.

The aim of this study was to evaluate the influence effect of storage time on the motility, morphology, and antioxidant status of spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides at a temperature of 5 °C. Furthermore, the effect of the storage variant (liquid storage vs. storage in the epididymides) on sperm parameters was determined on subsequent days of storage (D2, D4, D6). Sperm motility, viability, sperm morphology (including morphological defects), the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, CAT), and lipid peroxidation (based on malondialdehyde, MDA, content) were assessed in spermatozoa stored for up to six days.

2. Materials and Methods

2.1. Collection of Epididymal Sperm

Testicles and epididymides stored in scrotal sacs were collected from 32 European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) stags that were culled during legal hunts in the breeding season

(September–October). European red deer were hunter-harvested in the Nowe Ramuki Forest District (Warmian-Masurian Voivodeship, Poland) according to hunting and wildlife management rules. Testicles and epididymides were collected within 5 h after the hunt and were transported to the laboratory of the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

Sperm samples for analyses were obtained from the cauda epididymis by multiple incisions made with a scalpel and were collected in Eppendorf tubes [5]. During a preliminary assessment of sperm samples, sperm concentrations were determined using a Bürker chamber (Equimed-Medical Instruments, Cracow, Poland). In each sample, sperm motility was assessed subjectively under a microscope [5].

2.2. Sperm Storage in a Liquid State (Variant I)

Sperm collected from the cauda epididymis of each animal were stored in a liquid state. After standard evaluation, each sperm sample was diluted in Salomon's extender [4] (to a concentration of 100 $\times$ 10^6 spermatozoa/mL). The samples were then incubated at room temperature for two hours and stored for up to six days in a refrigerator at 5 °C.

2.3. Storage of Spermatozoa in the Epididymis (Variant II)

The second testicle with the epididymis was stored in scrotal sacs in the refrigerator for up to six days. In this variant, testicles with epididymides were randomly divided into three groups that were stored in the refrigerator for two days (D2, n = 11), four days (D4, n = 11), and six days (D6, n = 10). After refrigeration, sperm samples were collected, subjected to a standard evaluation, and diluted in Salomon's extender (100 $\times$ 10^6 spermatozoa/mL).

2.4. Sperm Analysis

Sperm motility, viability, morphology, antioxidant status, and lipid peroxidation were determined after dilution of sperm samples (D0) and on subsequent days of storage (D2, D4, and D6).

2.4.1. Assessment of Sperm Motility

Before the analysis, sperm samples were diluted with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) in a 1:4 ratio (to obtain a concentration of 20–30 $\times$ 10^6 spermatozoa/mL). The prepared samples were heated for approximately 5 min at 37 °C in a thermoblock (Thermo Block TDR-120, Göttingen, Germany). An aliquot (5 µL) of each sample was placed in a Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) preheated to 37 °C. Every sample was assessed in the CASA system and the Hamilton Thorne IVOS v. 12.3 sperm analyzer (Hamilton Thorne Bioscience, Beverley, MA, USA).

The evaluation involved software settings that were recommended by the manufacturer for analyses of gazelle/deer sperm: frame acquired—60, frame rate—60 Hz, minimum cell contrast—60, minimum cell size—5 pixels, straightness threshold—80%, low VAP cut-off—21.9 µm/s, low VSL cut-off—6 µm/s. Total motility (TMOT, %) and progressive motility (PMOT, %) were defined according to Hamilton Thorne requirements (VAP > 75 µm/s, STR > 80%).

2.4.2. Sperm Viability Analysis

Sperm viability was assessed using the Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Sperm samples were prepared for the analysis with the use of the Muse Count & Viability Kit (Luminex Corporation, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's recommendations. The reagent contains two dyes. The first dye penetrates the cell membrane and stains DNA, and nucleated cells are separated from non-nucleated cells and impurities. The second dye contains 7-aminoactinomycin D (7-AAD), which stains only cells with damaged cell membranes. This combination of dyes is used to differentiate between populations of live and dead cells. Before analysis, each sperm sample was diluted with DPBS

to a concentration of 1×10^6–1×10^7 cells/mL. An aliquot of 20 µL was combined with 380 µL of the Muse Count & Viability Kit reagent and incubated for 5 min at room temperature. Sperm viability was determined with the use of the Muse® Cell Analyzer.

2.4.3. Assessment of Sperm Morphology

The morphology of epididymal sperm was assessed by staining smears with the Giemsa method [27]. To prepare smear slides, 10 µL of the sperm sample (previously diluted with DPBS solution in a 1:4 ratio) was applied to a glass slide, spread over the entire slide, and left to dry at room temperature. Dried smears were fixed in a formalin buffer for 15 min, rinsed with water, and allowed to dry. The smears were then stained with Giemsa's solution for 180 min. Smear slides were rinsed with distilled water and dried. In each sample, 200 sperm cells were counted under a phase contrast microscope at ×1000 magnification with oil immersion. During the analysis, normal spermatozoa; spermatozoa with intact acrosomes; spermatozoa with head, tail, and midpiece defects; and spermatozoa with proximal and distal cytoplasmic droplets were counted (Figure 1).

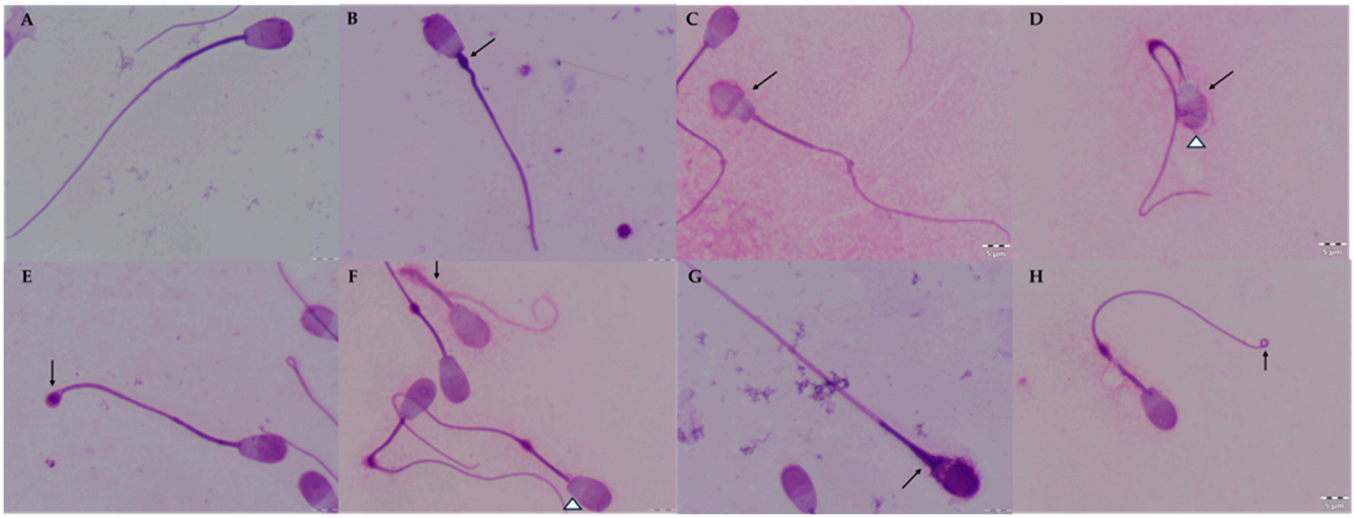


Figure 1. Morphological defects in European red deer epididymal spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides at 5 °C. (**A**)—normal spermatozoa; (**B**)—spermatozoa with proximal cytoplasmic droplets (↑); (**C**)—spermatozoa with head defects (↑); (**D**)—spermatozoa with head defects (↑) and damaged acrosomes (Δ); (**E**)—spermatozoa with distal cytoplasmic droplets (↑); (**F**)—spermatozoa with curled tails (↑), spermatozoa with head defects (Δ); (**G**)—spermatozoa with midpiece defects (↑); (**H**)—spermatozoa with a single bent tail (↑). Scale bars = 5 µm.

2.5. Activity of Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation

On designated days, 0.5 mL aliquots of diluted sperm samples were collected in separate Eppendorf tubes. Each sample was diluted with 0.5 mL of 0.85% NaCl to a concentration of 50×10^6 spermatozoa/mL. The samples were rinsed twice with 0.85% NaCl (3000× *g*, 5 min, 10 °C). The supernatant was discarded, and the precipitate was suspended in 1 mL of 0.85% NaCl. The prepared samples were frozen at −80 °C and stored for further analyses.

Sperm sediments were homogenized in a FastPrep®-24 apparatus (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) before the determination of antioxidant enzyme activity and MDA content. To obtain a clear supernatant, the samples were centrifuged at 12,000× *g* for 15 min at 10 °C, and the supernatant was transferred to clean Eppendorf tubes and stored at −80 °C for analysis.

2.5.1. Superoxide Dismutase Activity

Superoxide dismutase activity was assessed with a Beckman Coulter DU 800 spectrophotometer (Beckman Coulter INC., Fullerton, CA, USA). The samples were prepared

for analysis using the Ransod kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK), according to the instructions provided by the manufacturer. SOD activity was measured at a wavelength of 505 nm. One unit (U) of SOD was defined as the amount of the enzyme that caused 50% inhibition of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenyltetrazolium chloride (INT) reduction at 37 °C and pH 7.0. The results were expressed as U/10^6 spermatozoa (spz).

2.5.2. Glutathione Peroxidase Activity

Glutathione peroxidase activity was measured spectrophotometrically using a commercial Ransel assay (Randox Laboratories, Crumlin, UK) according to the manufacturer's instructions. GPx activity was measured at a wavelength of 340 nm. One GPx unit was defined as the amount of the enzyme that catalyzes the oxidation of 1 μM of NADPH per minute at 37 °C and pH 7.2. The results were expressed as U/10^6 spz.

2.5.3. Catalase Activity

Catalase activity was measured using a commercial Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. Catalase activity was measured by determining the amount of H_2O_2 remaining after the reaction catalyzed by CAT. CAT activity was measured spectrophotometrically at 520 nm. One CAT unit was defined as the amount of the enzyme that decomposed 1 μM of H_2O_2 per minute at 25 °C and pH 7.0. The results were expressed as U/10^6 spz.

2.5.4. Malondialdehyde (MDA) Content

Lipid peroxidation in sperm cell membranes was evaluated by spectrophotometric determination of MDA content with a commercial BIOXYTECH® MDA-586TM Assay Kit (OxisResearch, Burlingame, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The measurement was performed at a wavelength of 586 nm. The results were expressed as μM MDA/10^6 spz.

2.6. Statistical Analysis

Data were processed statistically in Statistica v. 12.5 (StatSoft Incorporation, Tulsa OK, USA). The normality of data distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. The results were analyzed with the use of non-parametric tests because the number of samples (*n*) differed across groups, and some variables did not have a normal distribution. Two independent samples were compared using the Mann–Whitney U test to determine the presence of significant differences between storage times in each variant and between storage variants on D2, D4, and D6. The results were presented as means ± SEM.

In addition, the presence of significant correlations ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$) between variables in each storage variant and storage time was determined by calculating Spearman's rank correlation coefficient. The results of the correlation analysis were presented for the sixth day of storage (Supplementary Materials).

3. Results

3.1. The Effect of Storage Time on the Motility, Viability, Morphology, and Antioxidant Status of Spermatozoa Stored in a Liquid State and in the Epididymides

Storage time significantly influenced the motility and viability of spermatozoa stored in a liquid state (variant I) and in the epididymides (variant II) (Figure 2). The percentage of motile sperm (TMOT) decreased significantly in both variants already on the second day of storage. The percentage of progressively motile spermatozoa (PMOT) and the percentage of spermatozoa with integral plasma membranes (Viability) also decreased significantly on D2 in sperm stored in the epididymides. In sperm stored in a liquid state, a significant decrease in PMOT and Viability was observed only on D4. However, on D6, TMOT and Viability exceeded 70%, and PMOT approximated 24% in variant I, whereas in variant II, TMOT and Viability decreased to approximately 30–40%, and PMOT decreased below 10%.

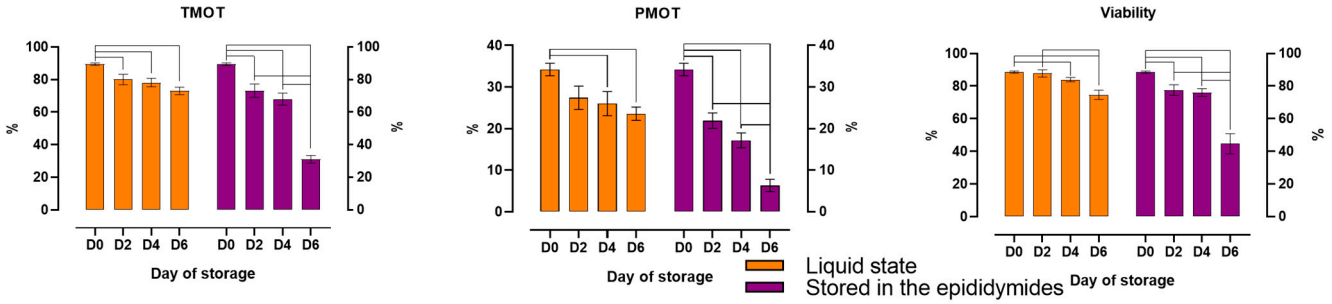


Figure 2. The effect of storage time on the motility and viability of spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides at 5 °C. TMOT, total motility; PMOT, progressive motility; Viability, live spermatozoa. The mean (±SEM) values of stored epididymal spermatozoa are presented. The results are significant at $p \leq 0.05$.

The changes in the morphology of spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides for six days are presented in Figure 3. The percentage of spermatozoa with normal morphology (MOR) was highest on D2 in samples stored in a liquid state. The values of MOR decreased gradually over time in both variants. In variant I, significant differences in MOR values were noted between D0 and D2, and between D0 and D2 vs. D4 and D6. In variant II, MOR decreased significantly to around 45% only on D6, compared with around 55% in variant I. Significant changes in acrosome integrity were also observed during storage. In both storage variants, the percentage of spermatozoa with normal apical ridge acrosomes (NAR) was lowest on D2 and D6 relative to D0. The percentage of spermatozoa with head (HD), midpiece (MD), and tail defects (TD) increased over time. In both variants, significant differences ($p \leq 0.05$) in HD and MD were noted between D0 and D6. A significant increase ($p \leq 0.05$) in HD and MD was observed on D6 in spermatozoa stored in the epididymides relative to those stored in a liquid state. The percentage of spermatozoa with tail defects (TD) also increased over time in both variants. However, significant differences ($p \leq 0.05$) in TD were noted only in variant I between D0 and D2, and between D2 vs. D4 and D6. The percentage of spermatozoa with proximal cytoplasmic droplets was highest on D2 in both variants, but significant differences ($p \leq 0.05$) in this parameter were observed only in variant II between D0 and D2. The percentage of spermatozoa with distal cytoplasmic droplets also decreased over time, in particular in variant II, where this parameter decreased from around 48% on D0 to around 20% on D6. In both variants, significant differences ($p \leq 0.05$) in this parameter were observed between D0 and D2.

The changes in the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides for six days are presented in Figure 4. Significant changes in SOD activity were observed over time, subject to storage variant. In samples stored in a liquid state, SOD activity was highest on D2 and D4. In spermatozoa stored in the epididymides, SOD activity was highest on D0 and decreased on successive days of storage. Significant differences ($p \leq 0.05$) in SOD activity were noted between D0 and D6 in both variants. In variant I, GPx activity and MDA content were highest on D4 and lowest on D6. Significant differences ($p \leq 0.05$) in the values of both parameters were observed between D0 and D4 in variant I. In variant II, GPx activity and MDA content were highest on D2 and lowest on D6. Significant differences ($p \leq 0.05$) in MDA content were noted between D0 and D6 in variant II. CAT activity was lowest on D4 in both variants, and significant differences ($p \leq 0.05$) in this parameter were observed only between D0 and D4.

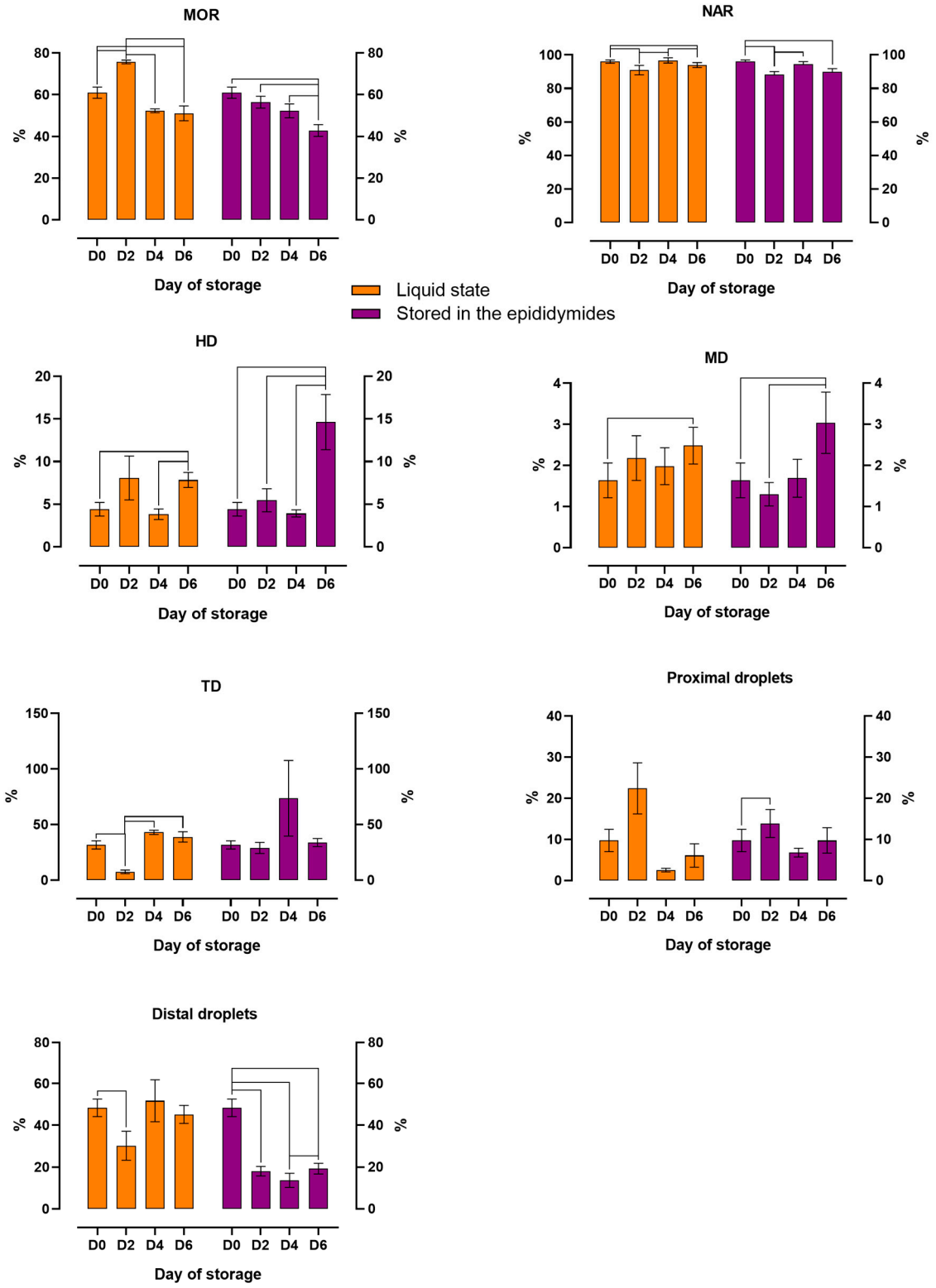


Figure 3. The effect of storage time on the morphology of spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides at 5 °C. MOR, normal sperm; NAR, normal apical ridge acrosomes; HD, head defects; MD, midpiece defects; TD, tail defects; proximal droplets; distal droplets. The mean (±SEM) values of stored epididymal sperm are presented. The results are significant at $p \leq 0.05$.

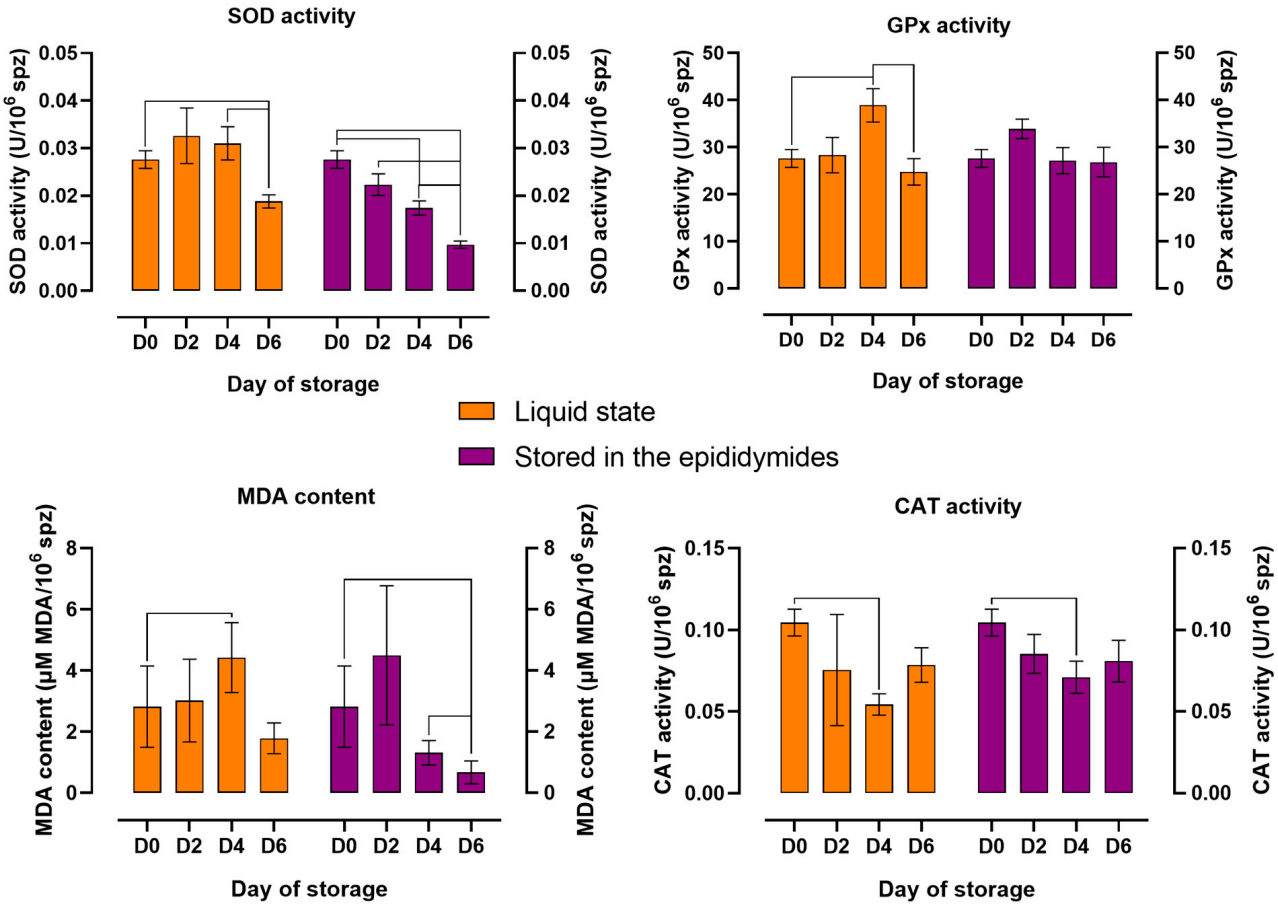


Figure 4. The effect of storage time on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides at 5 °C. SOD activity, superoxide dismutase activity; GPx activity, glutathione peroxidase activity; MDA content, malondialdehyde content; CAT activity, catalase activity. The mean (±SEM) values of stored epididymal sperm are presented. The results are significant at $p \leq 0.05$.

3.2. The Effect of Storage Variant on Sperm Motility, Viability, Morphology, and Antioxidant Status

The storage variant had a significant influence on the analyzed variables, depending on storage time (Table 1). The earliest significant differences between the compared variants were noted on D2 in MOR values, which can be attributed to higher TD values in variant II than in variant I. On D4, a significant decrease ($p \leq 0.05$) in PMOT, Viability, Distal Droplets, SOD and GPx activity, and MDA content, and a significant increase ($p \leq 0.05$) in Proximal Droplets were noted in epididymal sperm relative to sperm stored in a liquid state. On the last day of storage (D6), a further significant decrease in PMOT, Viability, Distal Droplets, and SOD activity, a decrease in TMOT values, and an increase in HD values were noted in variant II relative to variant I.

Table 1. The effect of storage variant (liquid state vs. storage in the epididymides) on the motility, viability, morphology, and antioxidant status of European red deer spermatozoa stored at 5 °C.

Sperm Quality Parameters	Day of Storage					
	D2 *n* = 11		D4 *n* = 11		D6 *n* = 10	
	Variant I	Variant II	Variant I	Variant II	Variant I	Variant II
TMOT	80.00 ± 3.16	73.17 ± 4.11	78.14 ± 2.66	68.00 ± 3.66	73.00 ± 2.26 ^{a}	31.00 ± 5.37 ^{b}
PMOT	27.40 ± 2.79	21.92 ± 1.86	26.00 ± 2.90 ^{a}	17.17 ± 1.77 ^{b}	23.58 ± 1.59 ^{a}	6.30 ± 1.48 ^{b}
Viability	87.80 ± 22.23	77.56 ± 3.26	84.02 ± 1.27 ^{a}	76.05 ± 2.37 ^{b}	74.61 ± 2.84 ^{a}	44.69 ± 6.22 ^{b}
MOR	75.74 ± 0.88 ^{a}	56.47 ± 2.86 ^{b}	52.35 ± 0.89	52.27 ± 3.34	51.08 ± 3.58	42.85 ± 2.84
NAR	90.94 ± 2.83	88.21 ± 1.86	96.73 ± 1.56	94.54 ± 1.48	93.93 ± 1.51	89.75 ± 2.09
HD	8.08 ± 2.58	5.47 ± 1.35	42.97 ± 1.98	3.92 ± 0.42	7.85 ± 0.88 ^{a}	14.63 ± 3.23 ^{b}
MD	2.18 ± 0.55	1.30 ± 0.29	1.98 ± 0.45	1.69 ± 0.46	2.48 ± 0.45	3.04 ± 0.74
TD	7.48 ± 1.65 ^{a}	28.99 ± 5.03 ^{b}	42.97 ± 1.98	73.60 ± 33.94	38.89 ± 4.62	33.80 ± 3.63
Prox Drop	22.41 ± 6.21	13.87 ± 3.40	2.55 ± 0.45 ^{a}	6.78 ± 1.04 ^{b}	6.11 ± 2.85	9.73 ± 3.09
Dist Drop	30.22 ± 6.91	18.05 ± 2.28	51.75 ± 10.03 ^{a}	13.65 ± 3.39 ^{b}	45.22 ± 4.32 ^{a}	19.28 ± 2.55 ^{b}
SOD activity	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01 ^{a}	0.02 ± 0.01 ^{b}	0.02 ± 0.01 ^{a}	0.01 ± 0.01 ^{b}
GPx activity	28.32 ± 3.75	33.88 ± 2.07	38.90 ± 3.54 ^{a}	27.17 ± 2.78 ^{b}	24.75 ± 2.80	26.85 ± 3.12
MDA content	3.02 ± 1.35	4.50 ± 2.28	4.43 ± 1.14 ^{a}	1.32 ± 0.40 ^{b}	1.79 ± 0.50	0.67 ± 0.37
CAT activity	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01

TMOT, total motility (%); PMOT, progressive motility (%); Viability, live spermatozoa (%); MOR, normal sperm (%); NAR, normal apical ridge acrosomes (%); HD, head defects (%); MD, midpiece defects (%); TD, tail defects (%); Prox Drop, Proximal Droplets (%); Dist Drop, Distal Droplets (%); SOD activity, superoxide dismutase activity (U/10^6 spz); GPx activity, glutathione peroxidase activity (U/10^6 spz); MDA content, malondialdehyde content (µm MDA/10^6 spz); CAT activity, catalase activity (U/10^6 spz). The mean (±SEM) values of stored epididymal sperm are presented. Values marked with different letters (^{a,b}) denote significant differences between storage variants on the same day of storage at $p \leq 0.05$.

4. Discussion

This is the first study to analyze the influence of storage time and short-term storage method on changes in the morphology and antioxidant status of European red deer epididymal sperm. Previous research was conducted on other animal species [18,28–30], whereas very few studies examined cervids and reported only on morphological changes [31,32].

Sperm motility and viability are crucial for successful fertilization, and these parameters were also analyzed in the present study. Motility is a key determinant of sperm quality [33] and suitability for assisted reproductive technologies (ART). The integrity of the acrosomal membrane is essential for sperm functions, including motility [34]. In the current study, the motility of spermatozoa stored in a liquid state and in the epididymides was similar to that noted by other researchers [3,6,10,13,35]. The motility and viability of epididymal spermatozoa stored in a liquid state were maintained at a satisfactory level (above 70%) until the sixth day of storage, which could indicate that their functional capacity was retained. This finding corroborates the results of our previous study, which demonstrated that epididymal sperm stored in a liquid state for up to 10 days remained useful for reproductive purposes [6]. In spermatozoa stored in the epididymides, comparable levels of motility and viability were observed only until the second day of storage, and a significant decrease in these parameters (to approx. 31% and 44%, respectively) was noted on the sixth day of storage. Motility and viability are closely correlated parameters [5], and this observation was confirmed in this study in both storage variants (Tables S1 and S2, Figure S1).

Storage induces many age-related changes that disrupt metabolic processes, increase lipid peroxidation, and cause damage to sperm structures [14,28,36,37]. In the present study, the percentage of spermatozoa with normal morphology decreased over time, but the prevalence of morphological defects differed across storage variants. The percentage of sperm with tail defects and, on the last day of storage (D6), with midpiece and head defects was significantly higher in spermatozoa stored in the epididymides than in a liquid state. These changes can undermine sperm motility and viability [34], which was observed on

D2 in spermatozoa stored in the epididymides, but only on D4 in sperm stored in a liquid state. Interestingly, a greater decrease in the percentage of spermatozoa with cytoplasmic droplets (in particular distal droplets) was noted in sperm stored in the epididymides than in a liquid state. Cytoplasmic droplets are characteristic of immature sperm cells, and they are commonly found in epididymal sperm [38–40]. Cytoplasmic droplets are shed during maturation, and the results of the present study indicate that epididymal storage supported sperm maturation. During liquid storage, the decrease in the percentage of spermatozoa with cytoplasmic droplets was correlated with changes in motility, and similar observations had been previously made in the epididymal sperm of mice [41], which suggests that cytoplasmic droplets play an important role in motility regulation [38]. Other researchers found that cytoplasmic droplets are transient organelles that provide the necessary energy for the maturation of epididymal spermatozoa [25,41].

Disruptions in metabolic processes, such as lipid peroxidation, induce irreversible damage to sperm structures [14]. Stored spermatozoa become more susceptible to oxidative damage caused by ROS. Reactive oxygen species are produced in the mitochondria and plasma membranes of spermatozoa, and their generation is controlled by the antioxidant system composed of enzymatic and non-enzymatic antioxidants [42,43]. The enzymatic system of many animal species is composed mainly of GPx, CAT, and SOD [14,22,42]. SOD is considered the key enzyme in the antioxidant defense system of spermatozoa [21,44].

In the current study, SOD activity in spermatozoa stored in a liquid state decreased over time, and similar results were reported in the spermatozoa of rams [45], cattle, and buffalo bulls during liquid storage [18]. In sperm stored in the epididymides, a significant decrease in SOD activity was reported much earlier (on D2). In addition, on D4, SOD activity was higher in spermatozoa stored in a liquid state than in the epididymides, which could suggest that the antioxidant capacity of sperm cells is more effectively preserved during liquid storage. Interestingly, GPx activity in the epididymal storage variant remained fairly constant during the entire storage period, whereas in sperm cells stored in a liquid state, the GPx activity was highest on D4. In contrast, GPx activity in cattle and buffalo bull spermatozoa continued to decrease on successive days of storage [18].

The content of MDA, a common biomarker of lipid peroxidation, increased during storage. This observation suggests that peroxidation occurred much earlier during epididymal storage (MDA content peaked on D2) than liquid storage (D4). The increase in MDA content was accompanied by an increase in GPx activity. The activity of this antioxidant enzyme probably increased to counteract excessive ROS production [14,46,47].

Lipid peroxidation is triggered by ROS, and ROS generation is controlled by SOD, GPx, and CAT. SOD catalyzes the dismutation of superoxide radicals (O^{2-}) to O_2 and H_2O_2 [22,48,49]. The generated H_2O_2 is decomposed by CAT to oxygen and water. In addition, H_2O_2 is neutralized by GPx and glutathione reductase [22,49,50].

In the present study, CAT activity was low in both storage variants, which could suggest that H_2O_2 in deer spermatozoa is reduced mainly by GPx. This observation corroborates the previous findings of Drevet et. al. [20]. Similarly to other antioxidant enzymes, CAT activity decreased over time. Low CAT activity could also suggest that deer sperm contain trace amounts of this enzyme. However, further research involving more sensitive tests and molecular techniques is needed to validate this hypothesis since CAT was not detected in the spermatozoa of many animal species, including cattle, dogs, and boars [22,51,52]. Several authors reported extremely low levels of CAT activity in human and rat spermatozoa [53,54]. In turn, CAT was detected in stallion sperm [29].

The antioxidant status of deer spermatozoa has not been investigated to date, and the present study provides novel information that could be used to develop new methods for storing epididymal spermatozoa.

5. Conclusions

The study demonstrated that the storage time of up to 6 days significantly affects the quality of the epididymal spermatozoa of European red deer stored in a liquid state

and in the epididymides. However, the motility, viability, morphology, and antioxidant status of deer spermatozoa are more effectively preserved during liquid storage than epididymal storage. Lipid peroxidation, morphological defects, and a decrease in SOD activity occurred earlier in spermatozoa stored in the epididymides than in a liquid state, which exerted a negative effect on sperm viability and motility. Low CAT activity in epididymal spermatozoa suggests that hydrogen peroxide in sperm cells is reduced mainly by GPx. Based on the present findings, liquid storage is more recommended for the short-term preservation of deer spermatozoa than epididymal storage. The results of this study also indicate that sperm stored in the epididymides at 5 °C for up to 4 days could be suitable for reproduction. Further comparative studies involving in vitro fertilization or artificial insemination are recommended to confirm these findings.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani14111653/s1, Figure S1: Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer epididymal spermatozoa stored in a liquid state (A) and in the epididymides (B) at 5 °C for 6 days. Table S1: Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer epididymal spermatozoa stored in a liquid state at 5 °C for 6 days. Table S2: Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer spermatozoa stored in the epididymides at 5 °C for 6 days.

Author Contributions: Conceptualization, N.M.N. and A.D.; methodology, N.M.N. and A.D.; analysis, N.M.N. and A.O.; resources, Ż.S.-B.; writing—original draft preparation, N.M.N.; writing—review and editing, A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funded by the Minister of Science under "the Regional Initiative of Excellence Program" (RID/SP/0025/2024/01) and the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (project No. 11.610.003-110).

Institutional Review Board Statement: A hunting license was obtained for the needs of this study. The animals were hunter-harvested in accordance with hunting and game management regulations stipulated in Section 10 of the Polish Hunting Law of 13 October 1995 and European Union regulations.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The samples were obtained under a scientific cooperation agreement concluded between the University of Warmia and Mazury in Olsztyn and Nowe Ramuki Forest District. The authors would like to thank the employees of Nowe Ramuki Forest Inspectorate, especially K. Zdun and T. Dzietowiecki, as well as the hunters for their help in collecting samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Asher, G.W.; Berg, D.K.; Evans, G. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *62*, 195–211. [CrossRef] [PubMed]
2. Garde, J.J.; Martínez-Pastor, F.; Gomendio, M.; Malo, A.F.; Soler, A.J.; Fernández-Santos, M.R.; Esteso, M.C.; García, A.J.; Anel, L.; Roldán, E.R.S. The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. *Reprod. Domest. Anim.* **2006**, *41*, 93–102. [CrossRef] [PubMed]
3. Dziekońska, A.; Neuman, N.M.; Burdal, K.K.; Wiszniewska-Łaszczych, A.; Bogdaszewski, M. The Effect of Different Extenders on the Quality Characteristics of European Red Deer Epididymal Sperm Stored at 5 °C. *Animals* **2022**, *12*, 2669. [CrossRef] [PubMed]
4. Fernández-Santos, M.R.; Esteso, M.C.; Soler, A.J.; Montoro, V.; Garde, J.J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* **2006**, *41*, 114–118. [CrossRef] [PubMed]
5. Dziekońska, A.; Niedźwiecka, E.; Niklewska, M.E.; Koziorowska-Gilun, M.; Kordan, W. Viability longevity and quality of epididymal sperm stored in the liquid state of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). *Anim. Reprod. Sci.* **2020**, *213*, 106269. [CrossRef]

6. Dziekońska, A.; Koziorowska-Gilun, M.; Kordan, W.; Neuman, N.M.; Kotlarczyk, A.M.; Korzekwa, A.J. The Quality and Fertilizing Potential of Red Deer (*Cervus elaphus* L.) Epididymal Spermatozoa Stored in a Liquid State. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14591. [CrossRef] [PubMed]
7. Martinez-Pastor, F.; Anel, L.; Guerra, C.; Alvarez, M.; Soler, A.J.; Garde, J.J.; Chamorro, C.; da Paz, P. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* **2006**, *66*, 1847–1856. [CrossRef] [PubMed]
8. Fernández-Santos, M.R.; Martinez-Pastor, F.; Garcia-Macias, V.; Esteso, M.C.; Soler, A.J.; da Paz, P.; Anel, L.; Garde, J.J. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* **2007**, *67*, 738–753. [CrossRef] [PubMed]
9. Fernández-Santos, M.R.; Dominguez-Rebolledo, A.E.; Esteso, M.C.; Garde, J.J.; Martínez-Pastor, F. Refrigerated Storage of Red Deer Epididymal Spermatozoa in the Epididymis, Diluted and with Vitamin C Supplementation. *Reprod. Domest. Anim.* **2009**, *44*, 212–220. [CrossRef]
10. Neuman, N.M.; Dziekońska, A.; Orzołek, A.; Gilun, P. A comparison of the biological properties of European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) spermatozoa stored in the epididymides and in a liquid state at 5 °C. *Anim. Reprod. Sci.* **2024**, *260*, 107387. [CrossRef]
11. Morrow, C.J.; Penfold, L.M.; Wolfe, B.A. Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. *Theriogenology* **2009**, *71*, 149–165. [CrossRef] [PubMed]
12. Comizzoli, P.; Mauget, R.; Mermillod, P. Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* **2001**, *56*, 261–274. [CrossRef] [PubMed]
13. Soler, A.J.; Esteso, M.C.; Fernández-Santos, M.R.; Garde, J.J. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5 °C in the epididymis for several days. *Theriogenology* **2005**, *64*, 1503–1517. [CrossRef] [PubMed]
14. Partyka, A.; Łukaszewicz, E.; Niżański, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* **2012**, *77*, 1497–1504. [CrossRef] [PubMed]
15. Cassani, P.; Beconi, M.T.; O'Flaherty, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Anim. Reprod. Sci.* **2005**, *86*, 163–173. [CrossRef]
16. Aitken, R.J.; Roman, S.D. Antioxidants systems and oxidative stress in the testes. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Advances in Experimental Medicine and Biology*; Cheng, Y.C., Ed.; Landes Bioscience: Austin, TX, USA; Springer Science Business Media: Boston, MA, USA, 2008; Volume 636, pp. 154–171.
17. Chabory, E.; Damon, C.; Lenoir, A.; Henry-Berger, J.; Vernet, P.; Cadet, R.; Saez, F.; Drevet, J.R. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 1321–1331. [CrossRef] [PubMed]
18. Nair, S.J.; Brar, A.S.; Ahuja, C.S.; Sangha, S.P.S.; Chaudhary, K.C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, *96*, 21–29. [CrossRef] [PubMed]
19. Koziorowska-Gilun, M.; Fraser, L.; Gilun, P.; Koziorowski, M.; Kordan, W. Activity of antioxidant enzymes and their mRNA expression in different reproductive tract tissues of the male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the pre-rut and rut seasons. *Small Rumin. Res.* **2015**, *129*, 97–103. [CrossRef]
20. Drevet, J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *250*, 70–79. [CrossRef]
21. Bartosz, G. *Druga Twarz Tlenu*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Polska, 2013; pp. 87–91.
22. Koziorowska-Gilun, M.; Koziorowski, M.; Fraser, L.; Strzeżek, J. Antioxidant Defence System of Boar Cauda Epididymidal Spermatozoa and Reproductive Tract Fluids. *Reprod. Domest. Anim.* **2011**, *46*, 527–533. [CrossRef]
23. Agarwal, A.; Virk, G.; Ong, C.; du Plessis, S.S. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J. Men's Health* **2014**, *32*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
24. Domínguez-Rebolledo, A.E.; Fernández-Santos, M.R.; Bisbal, A.; Ros-Santaella, J.L.; Ramón, M.; Carmona, M.; Martínez-Pastor, F.; Garde, J.J. Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reprod. Fertil. Dev.* **2010**, *22*, 856–870. [CrossRef] [PubMed]
25. Kozioł, K.; Koziorowski, M. Morphological defects of epididymal spermatozoa in male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the reproductive season. *Pol. J. Vet. Sci.* **2015**, *18*, 565–572. [CrossRef] [PubMed]
26. Malo, A.F.; Garde, J.J.; Soler, A.J.; García, A.J.; Gomendio, M.; Roldan, E. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 822–829. [CrossRef] [PubMed]
27. Watson, P.F. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* **1975**, *97*, 12–15. [CrossRef] [PubMed]
28. Wysokińska, A.; Szablicka, D.; Dziekońska, A.; Wójcik, E. Analysis of changes in the morphological structures of sperm during preservation of liquid boar semen in two different seasons of the year. *Anim. Reprod. Sci.* **2023**, *256*, 107297. [CrossRef] [PubMed]
29. Kankofer, M.; Kolm, G.; Aurich, J.; Aurich, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* **2005**, *63*, 1354–1365. [CrossRef] [PubMed]
30. Perumal, P. Effect of Superoxide Dismutase on Semen Parameters and Antioxidant Enzyme Activities of Liquid Stored (5 °C) Mithun (*Bos frontalis*) Semen. *J. Anim.* **2014**, *2014*, 821954. [CrossRef]

31. Soler, A.J.; Pérez-Guzmán, M.D.; Garde, J.J. Storage of red deer epididymides for four days at 5 degrees C: Effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* **2003**, *295*, 188–199. [CrossRef]
32. Hishinuma, M.; Suzuki, K.; Sekine, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. *Theriogenology* **2003**, *59*, 813–820. [CrossRef]
33. Dott, H.M.; Foster, G.C. The estimation of sperm motility in semen, on membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *J. Reprod. Fertil.* **1979**, *55*, 161–166. [CrossRef] [PubMed]
34. Love, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* **2011**, *76*, 547–557. [CrossRef] [PubMed]
35. Martínez-Pastor, F.; Diaz-Corujo, A.R.; Anel, E.; Herraez, P.; Anel, L.; de Paz, P. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* **2005**, *64*, 958–974. [CrossRef]
36. Conejo-Nava, J.; Fierro, R.; Gutierrez, C.G.; Betancourt, M. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 °C. *Arch. Androl.* **2003**, *49*, 287–295. [CrossRef]
37. Neild, D.M.; Brouwers, J.F.H.M.; Colenbrander, B.; Agüero, A.; Gadella, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **2005**, *72*, 230–238. [CrossRef] [PubMed]
38. Ros-Santaella, J.L.; Domínguez-Rebolledo, A.E.; Garde, J.J. Sperm flagellum volume determines freezability in red deer spermatozoa. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112382. [CrossRef]
39. Xu, H.; Yuan, S.-Q.; Zheng, Z.-H.; Yan, W. The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian J. Androl.* **2013**, *15*, 799–805. [CrossRef]
40. Cooper, T.G.; Yeung, C.-H.; Fetic, S.; Sobhani, A.; Nieschlag, E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Hum. Reprod.* **2004**, *19*, 2283–2288. [CrossRef]
41. Yuan, S.; Zheng, H.; Zheng, Z.; Yan, W. Proteomic Analyses Reveal a Role of Cytoplasmic Droplets as an Energy Source during Epididymal Sperm Maturation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77466. [CrossRef]
42. Marchlewicz, M.; Szypulska-Koziarska, D.; Grzegrzółka, A.; Kruk, J.; Duchnik, E.; Wiszniewska, B. Ochrona przed stresem oksydacyjnym w męskim układzie płciowym. *Pomeranian J. Life Sci.* **2016**, *62*, 44–52. [CrossRef]
43. Agarwal, A.; Saleh, R.A.; Bedaiwy, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* **2003**, *79*, 829–843. [CrossRef] [PubMed]
44. Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L.; Storey, B.T. Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa Superoxide Dismutase as Major Enzyme Protectant against Oxygen Toxicity. *J. Androl.* **1987**, *8*, 338–348. [CrossRef]
45. Hashem, E.Z.; Haddad, R.; Eslami, M. Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Rumin. Res.* **2017**, *150*, 30–39. [CrossRef]
46. Coyan, K.; Başpınar, N.; Bucak, M.N.; Akalin, P.P.; Ataman, M.B.; Omür, A.D.; Güngör, S.; Küçükgünay, S.; Ozkalp, B.; Sarıözkan, S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res. Vet. Sci.* **2010**, *89*, 426–431. [CrossRef] [PubMed]
47. Bayomy, M.F.F.; El-Nabi, S.E.H.; El Kassas, T.A.; Attia, Z.I.; Saeed, A.M.; Taha, H.S.A.; Alagawany, M.; Galosi, L.; Biagini, L.; El-Kassas, S. Extender Supplementation with Glutathione (GSH) and Taurine Improves In Vitro Sperm Quality and Antioxidant Status of New Zealand Rabbits during Chilled Storage for up to 72 hours. *Vet. Med. Int.* **2023**, *2023*, 8339591. [CrossRef] [PubMed]
48. Koziorowska-Gilun, M.; Szurnicka, M.; Dziekonska, A.; Kordan, W.; Giżejewski, Z.; Filipowicz, K. Characteristics of Antioxidant Systems of Yellow Fraction of Red Deer's (*Cervus elaphus* L.) Semen During the Rutting Period. *Reprod. Domest. Anim.* **2016**, *51*, 248–254. [CrossRef]
49. Gotowiecka, M.; Niżański, W.; Partyka, A.; Strzeżek, R.; Koziorowska-Gilun, M. Mechanizm obrony antyoksydacyjnej i oddziaływanie reaktywnych form tlenu na plemniki samców zwierząt domowych. *Med. Wet.* **2015**, *71*, 418–422.
50. Aitken, R.J.; Buckingham, D.W.; Carreras, A.; Irvine, D.S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: Relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *21*, 495–504. [CrossRef] [PubMed]
51. Bilodeau, J.F.; Chatterjee, S.; Sirard, M.A.; Gagnon, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* **2000**, *55*, 282–288. [CrossRef]
52. Strzezek, R.; Koziorowska-Gilun, M.; Kowalówka, M.; Strzezek, J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol. J. Vet. Sci.* **2009**, *12*, 55–60.
53. Jeulin, C.; Soufir, J.C.; Weber, P.; Laval-Martin, D.; Calvayrac, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* **1989**, *24*, 185–196. [CrossRef] [PubMed]
54. Tramer, F.; Rocco, F.; Micali, F.; Sandri, G.; Panfili, E. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* **1998**, *59*, 753–758. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

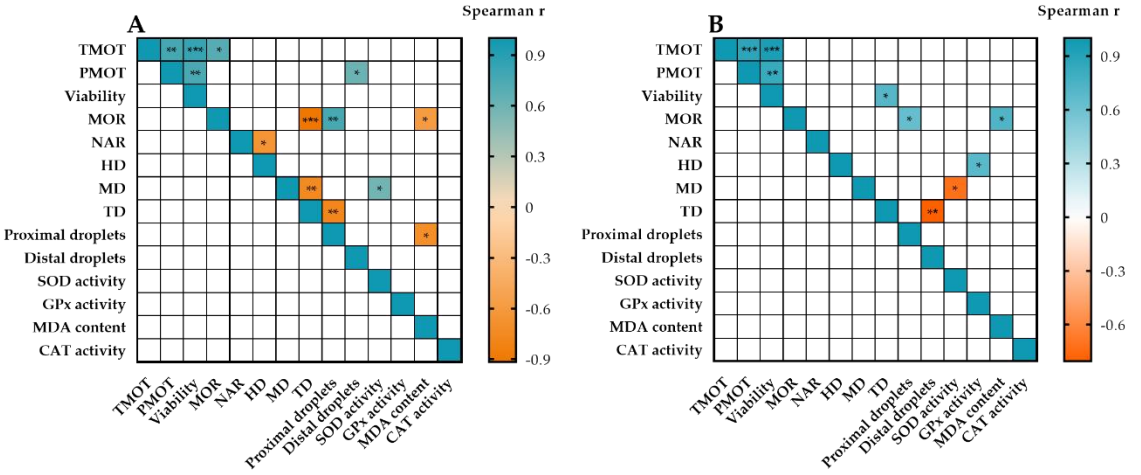


Figure S1. Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer epididymal spermatozoa stored in a liquid state (A) and in the epididymides (B) at 5°C for 6 days. The values of Spearman's rank correlation coefficients (Spearman r) are presented on a color gradient. * Significant at $p \leq 0.05$; ** Significant at $p \leq 0.01$; *** Significant at $p \leq 0.001$; TMOT, total motility (%); PMOT, progressive motility (%); Viability, live spermatozoa (%); MOR, normal sperm (%); NAR, normal apical ride acrosomes (%); HD, head defects (%); MD, midpiece defects (%); TD, tail defects (%); Proximal Droplets (%); Distal Droplets (%); SOD activity, superoxide dismutase activity (U/10^6 spz); GPx activity, glutathione peroxidase activity (U/10^6 spz); MDA content, malondialdehyde content (µm MDA/10^6 spz); CAT activity, catalase activity (U/10^6 spz).

Table S1. Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer epididymal spermatozoa stored in a liquid state at 5 °C for 6 days.

	TMOT	PMOT	Viability	MOR	NAR	HD	MD	TD	Proximal droplets	Distal droplets	SOD activity	GPx activity	MDA content	CAT activity
TMOT	1	0.772**	0.832***	0.695*	-0.200	0.172	0.298	-0.512	0.325	0.098	0.418	-0.414	-0.123	-0.298
PMOT		1	0.749**	0.408	0.067	0.046	0.236	-0.221	0.071	0.601*	0.327	-0.239	0.074	-0.236
Viability			1	0.462	0.021	0.266	0.175	-0.245	0.253	0.133	0.161	-0.315	-0.084	-0.517
MOR				1	-0.119	0.035	0.545	-0.916***	0.756**	-0.266	0.168	-0.112	-0.580*	-0.028
NAR					1	-0.657*	-0.315	0.273	0.179	0.434	-0.245	0.063	-0.189	0.140
HD						1	0.441	-0.168	-0.098	-0.399	0.196	-0.112	0.385	-0.490
MD							1	-0.748**	0.534	-0.287	0.580*	0.343	-0.063	-0.280
TD								1	-0.780**	0.448	-0.329	-0.028	0.538	0.084
Proximal droplets									1	-0.436	0.102	-0.014	-0.714**	-0.285
Distal droplets										1	0.049	0.021	0.287	0.280
SOD activity											1	0.140	0.364	-0.189
GPx activity												1	0.035	0.399
MDA content													1	-0.112
CAT activity														1

* Significant at $p \leq 0.05$; ** Significant at $p \leq 0.01$; *** Significant at $p \leq 0.001$; TMOT, total motility (%); PMOT, progressive motility (%); Viability, live spermatozoa (%); MOR, normal sperm (%); NAR, normal apical ride acrosomes (%); HD, head defects (%); MD, midpiece defects (%); TD, tail defects (%); Proximal droplets (%); Distal droplets (%); SOD activity, superoxide dismutase activity (U/10^6); GPx activity, glutathione peroxidase activity (U/10^6); MDA content, malondialdehyde content (µm MDA/10^6); CAT activity, catalase activity (U/10^6).

Table S2. Correlation coefficients describing the relationships between the quality parameters of European red deer spermatozoa stored in the epididymides at 5 °C for 6 days.

	TMOT	PMOT	Viability	MOR	NAR	HD	MD	TD	Proximal droplets	Distal droplets	SOD activity	GPx activity	MDA content	CAT activity
TMOT	1	0.873***	0.942***	0.322	0.571	-0.565	-0.140	0.474	-0.152	-0.316	0.061	-0.170	-0.237	-0.347
PMOT		1	0.821**	-0.056	0.352	-0.438	0.049	0.463	-0.309	-0.358	-0.130	-0.136	-0.562	-0.025
Viability			1	0.152	0.612	-0.539	-0.212	0.697*	-0.382	-0.503	0.176	-0.115	-0.333	-0.491
MOR				1	0.418	-0.539	-0.212	-0.152	0.636*	0.212	0.018	-0.394	0.721*	-0.345
NAR					1	-0.503	0.030	0.382	0.127	-0.333	-0.358	-0.285	0.079	-0.491
HD						1	0.370	-0.479	-0.103	0.261	-0.055	0.685*	-0.006	0.503
MD							1	-0.321	0.200	0.418	-0.721*	-0.042	0.006	0.467
TD								1	-0.564	-0.806**	0.358	0.055	-0.394	-0.442
Proximal droplets									1	0.333	-0.442	-0.212	0.455	0.042
Distal droplets										1	-0.188	-0.285	0.515	0.333
SOD activity											1	0.285	0.079	-0.345
GPx activity												1	-0.115	0.394
MDA content													1	-0.018
CAT activity														1

* Significant at $p \leq 0.05$; ** Significant at $p \leq 0.01$; *** Significant at $p \leq 0.001$; TMOT, total motility (%); PMOT, progressive motility (%); Viability, live spermatozoa (%); MOR, normal sperm (%); NAR, normal apical ride acrosomes (%); HD, head defects (%); MD, midpiece defects (%); TD, tail defects (%); Proximal droplets (%); Distal droplets (%); SOD activity, superoxide dismutase activity (U/10^6); GPx activity, glutathione peroxidase activity (U/10^6); MDA content, malondialdehyde content (µm MDA/10^6); CAT activity, catalase activity (U/10^6).

Olsztyn, 17.06.2025

Nicoletta Magdalena Neuman
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy: **Neuman N.M., Orzołek A., Steiner-Bogdaszewska Ż., Dziekońska A. 2024, Changes in the Morphology and Antioxidant Status of European Red Deer Sperm Stored in the Epididymides and in a Liquid State. Animals, 14, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Neuman Nicoletta
(podpis kandydata)

Olsztyn, 17.06.2025

dr inż. Aleksandra Orzołek
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Orzołek A., Steiner-Bogdaszewska Ż., Dziekońska A. 2024, Changes in the Morphology and Antioxidant Status of European Red Deer Sperm Stored in the Epididymides and in a Liquid State. Animals, 14, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Aleksandra Orzołek
podpis/podpisy

Olsztyn, 17.06.2025

dr Żaneta Steiner-Bogdaszewska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Orzołek A., Steiner-Bogdaszewska Ż., Dziekońska A. 2024, Changes in the Morphology and Antioxidant Status of European Red Deer Sperm Stored in the Epididymides and in a Liquid State. Animals, 14, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: dostarczeniu materiału do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

.....
podpis/podpisy

Olsztyn, 17.06.2025

dr hab. Anna Dziekońska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Orzołek A., Steiner-Bogdaszewska Ż., Dziekońska A. 2024, Changes in the Morphology and Antioxidant Status of European Red Deer Sperm Stored in the Epididymides and in a Liquid State. Animals, 14, 1653. https://doi.org/10.3390/ani14111653** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji i metodyki badań oraz recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

.....
podpis/podpisy

ZAŁĄCZNIK 3

PUBLIKACJA 3 (P3)

Neuman, N. M., Gilun, P., Koziorowska-Gilun, M., Janiszewski, P., Dziekońska, A. (2025). Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the reproductive tissues of male European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). *International Journal of Molecular Sciences*, *26*, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in the Reproductive Tissues of Male European Red Deer (*Cervus elaphus elaphus*)

Nicoletta M. Neuman [1], Przemysław Gilun [2,*], Magdalena Koziorowska-Gilun [1], Paweł Janiszewski [3] and Anna Dziekońska [1,*]

[1] Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Poland; nicoletta.neuman@uwm.edu.pl (N.M.N.); magda.koziorowska@uwm.edu.pl (M.K.-G.)
[2] Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Trylińskiego 18, 10-683 Olsztyn, Poland
[3] Department of Fur-Bearing Animal Breeding and Game Management, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn, Poland; janisz@uwm.edu.pl (P.J.)
* Correspondence: p.gilun@pan.olsztyn.pl (P.G.); a.dziekonska@uwm.edu.pl (A.D.)

Abstract

The aim of this study was to analyze the influence of season (rut and non-rut) on the antioxidant status of selected reproductive tissues in male European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). Tissue samples were collected post mortem from the testes and epididymides (caput, corpus, and cauda) of 24 animals. The activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase—SOD, glutathione peroxidase—GPx, and catalase—CAT) and the mRNA expression of SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5, and CAT were examined. In addition, these proteins were identified by western blot. ANOVA revealed that season, type of tissue, and the interaction between these factors significantly ($p \leq 0.05$) influenced the activity and mRNA expression of the analyzed enzymes. The activity of SOD and GPx peaked in the corpus epididymis in the rut season and in the caput epididymis in the non-rut season. Regardless of season, the relative abundances of GPx4, SOD1, SOD2, and SOD3 mRNA were highest in the testis, and GPx5 mRNA—in the caput epididymis. The activity of SOD and CAT was significantly higher during the non-rut season compared with the rut season, but only in the caput epididymis. This study demonstrated that the activity of antioxidant enzymes and the relative mRNA expression varies across tissues and seasons to provide the reproductive system of European red deer with the required antioxidant protection. Further research is needed to expand our understanding of the antioxidant defense system in the reproductive tract of European red deer.

Keywords: European red deer; tissues; male reproductive system; antioxidant; genes; protein

Academic Editor: Elisabetta Baldi

Received: 17 June 2025
Revised: 16 July 2025
Accepted: 23 July 2025
Published: 25 July 2025

Citation: Neuman, N.M.; Gilun, P.; Koziorowska-Gilun, M.; Janiszewski, P.; Dziekońska, A. Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in the Reproductive Tissues of Male European Red Deer (*Cervus elaphus elaphus*). *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are produced in all living organisms and play an important role in normal physiological processes [1,2]. However, excessive generation of ROS leads to oxidative stress and has a negative impact on the production and maturation of gametes and all bodily tissues [1,3]. All living organisms possess defense mechanisms

against the adverse effects of oxidative stress. The antioxidant defense mechanism relies on the coordinated action of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and catalase (CAT), known as the catalytic triad [4–6], as well as low-molecular-weight antioxidants such as vitamin C, L-glutathione, and vitamin E [2,7,8].

Superoxide dismutase exists in three isoforms: copper/zinc SOD (Cu/Zn SOD, SOD1), manganese SOD (Mn-SOD, SOD2), and extracellular SOD (Ec-SOD, SOD3) [5]. The SOD1 isoform is localized in the cytoplasm, mitochondrial intermembrane space, and the cell nucleus [9]. The SOD2 isoform has been identified in the mitochondrial matrix [10], and SOD3—in the testes and epididymides of various animals, including the European bison [6]. In the disproportionation reaction, SOD neutralizes the superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) to form toxic hydrogen peroxide (H_2O_2), which is then broken down by CAT or GPx [4,11,12]. Catalase shows affinity for H_2O_2 when this compound occurs at a high concentration in a cell. However, H_2O_2 is degraded by GPx when its levels are low [13]. Cytosolic glutathione peroxidase (GSH-Px) protects testes against toxic H_2O_2 [14]. Two isoforms of GPx—phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx/GPx4) and GPx5—have been identified in the reproductive system of many mammalian species [2,6,15–17]. The GPx4 isoform is localized in the testes and spermatozoa, whereas GPx5 is present in the plasma membrane of male gametes and in the caput epididymis [18]. In mammals, GPx4 and GPx5 play a key role in the antioxidant defense system of the male reproductive system [2,18,19], and they participate in fertilization processes [20–22].

The red deer (including European red deer) is a wild animal with considerable ecological and economic significance [23,24]. Due to its feeding habits, this species plays an important role in the forest ecosystem, influencing the diversity and structure of vegetation in the environment. Furthermore, it provides a food source for predators such as wolves and lynxes, which influences the balance of the entire ecosystem. Red deer reproduction is characterized by synchronized timing of breeding and calving, which is crucial for population development and is dependent on environmental factors, including food availability and the climate [25,26]. Understanding the ecological aspects and physiology of wild animals, including the European red deer, can contribute to the development of an effective conservation strategy for various cervid species and better management of their populations.

The rut season of the European red deer typically occurs in September and October [27]. During the rut season, hormonal changes initiate spermatogenesis and can significantly affect oxidative stress levels in reproductive tissues [28]. Previous research has shown that oxidative stress has a negative impact on semen quality and the fertilizing capacity of spermatozoa [8,17]. Most studies on oxidative stress and antioxidant defenses in the male reproductive system have been conducted on livestock and companion animals [12,16,28–32], whereas the number of scientific reports concerning free-living animals is limited [6,15,33]. There is a general scarcity of research on the antioxidant status of the reproductive system of European red deer stags during the rut and non-rut seasons. Therefore, the present study was conducted on the assumption that season (rut vs. non-rut) can significantly affect the antioxidant status of reproductive tissues in European red deer.

In view of the above, the aim of this study was to analyze the influence of season (rut season and non-rut season) on the antioxidant status of selected reproductive tissues in male European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). This goal was achieved by analyzing the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, and CAT) and the relative abundance of mRNA of SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5, and CAT genes. The presence of these proteins, i.e., SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5, and CAT, in the testes and epididymides (caput, corpus, and cauda) was also determined by western blot.

2. Results

The ANOVA revealed that season (rut and non-rut), tissues (testis and caput, corpus, and cauda epididymis), and the interaction between these factors significantly ($p \leq 0.05$) influenced all activities of the antioxidant enzymes SOD, GPx, and CAT (Table 1).

Table 1. The effect of season and tissue on enzyme activity in ANOVA.

Enzyme Activity	Season		Tissue		Season × Tissue	
	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**
SOD activity	19.968	<0.001	10.323	<0.001	7.780	<0.001
GPx activity	7.437	0.007	7.868	<0.001	4.285	0.006
CAT activity	7.803	0.006	5.940	<0.001	3.160	0.026

Values are significant at $p \leq 0.05$; SOD activity—superoxide dismutase activity; GPx activity—glutathione peroxidase activity; CAT activity—catalase activity.

The sampling season significantly ($p < 0.05$) affected the expression of SOD3, GPx4, GPx5, and CAT genes (Table 2). Type of tissue highly significantly ($p < 0.001$) affected the mRNA expression of the examined genes. In turn, the season × tissue interaction significantly influenced the mRNA expression of all genes, excluding the SOD3 gene.

Table 2. The effect of season and tissue on gene expression in ANOVA.

Gene Expression	Season		Tissue		Season × Tissue	
	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**	***F* Value**	***p* Value**
SOD1 expression	0.610	n.s.	11.576	<0.001	3.330	0.020
SOD2 expression	1.280	n.s.	137.558	<0.001	4.700	0.003
SOD3 expression	16.495	<0.001	12.885	<0.001	2.455	n.s.
GPx4 expression	6.442	0.012	254.887	<0.001	2.712	0.045
GPx5 expression	34.054	<0.001	100.495	<0.001	6.300	<0.001
CAT expression	5.639	0.018	53.686	<0.001	12.883	<0.001

Values are significant at $p \leq 0.05$; n.s.—not significant; SOD1 expression—relative abundance of cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase mRNA; SOD2 expression—relative abundance of manganese superoxide dismutase mRNA; SOD3 expression—relative abundance of extracellular SOD mRNA; GPx4 expression—relative abundance of glutathione peroxidase 4 mRNA; GPx5 expression—relative abundance of glutathione peroxidase 5 mRNA; CAT expression—relative abundance of catalase mRNA.

2.1. Activity of Antioxidant Enzymes

The sampling season (rut and non-rut) and type of tissue significantly influenced the activity of antioxidant enzymes (Figure 1). The activity of SOD in the testis and in the caput and cauda epididymis was significantly ($p \leq 0.05$) higher during the non-rut season compared with that during the rut season. During the rut season, this parameter was also significantly higher in the corpus epididymis than in the testis and cauda epididymis. During the non-rut season, SOD activity was significantly higher in the caput epididymis than in the testis.

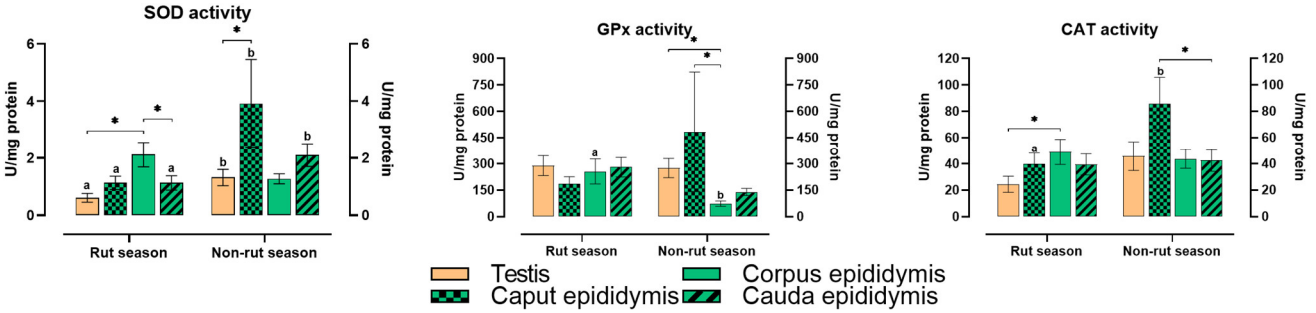


Figure 1. Activity of antioxidant enzymes in the reproductive tissues of male European red deer in rut and non-rut seasons. SOD activity—superoxide dismutase activity; GPx activity—glutathione peroxidase activity; CAT activity—catalase activity. The mean (±SEM) values of antioxidant enzyme activity are presented. a, b—significant at $p \leq 0.05$ between seasons. Values marked with * denote significant differences at $p \leq 0.05$ between the analyzed tissues in each season.

Significant seasonal differences in GPx activity were noted only in the corpus epididymis, where the examined parameter was significantly higher during the rut season. However, GPx activity peaked in the caput epididymis during the non-rut season. During the non-rut season, significant differences in GPx activity were observed between the corpus epididymis vs. the testis and the caput epididymis.

Season affected CAT activity only in the caput epididymis. In this tissue, CAT activity was significantly higher in the non-rut season compared with that in the rut season. During the rut season, CAT activity was significantly higher in the corpus epididymis than in the testis. During the non-rut season, CAT activity was significantly higher in the caput epididymis than in the cauda epididymis.

2.2. Relative Abundance of Analyzed Enzymes

The abundance of SOD1 mRNA in the examined tissues did not differ significantly between seasons. Regardless of season, the relative abundance of SOD1 mRNA was significantly ($p \leq 0.05$) higher in the corpus epididymis than in the cauda epididymis (Figure 2). During the non-rut season, the examined parameter was significantly higher in the testis than in the caput and cauda epididymis.

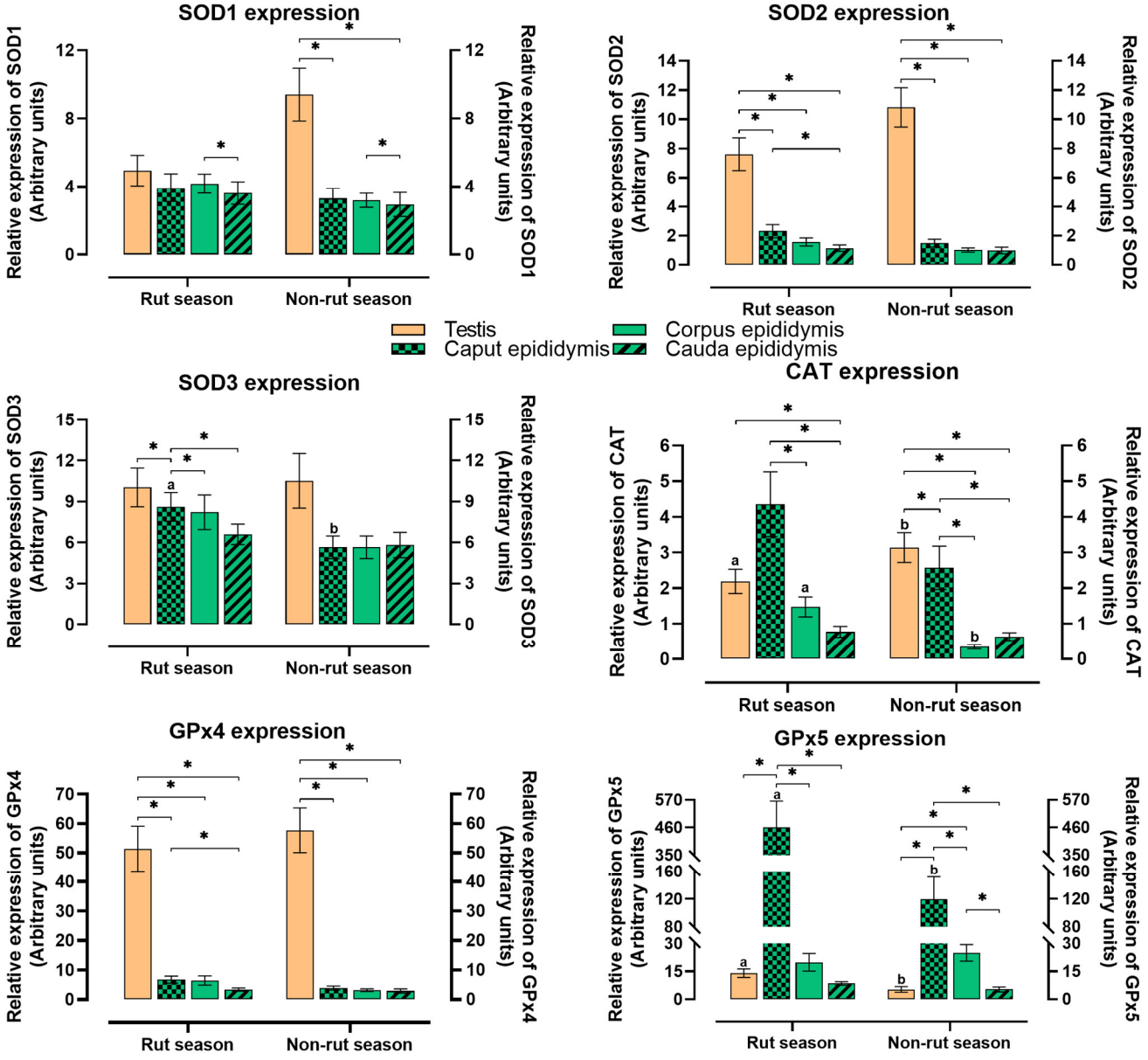


Figure 2. Relative mRNA abundance of the analyzed genes in the reproductive tissues of male European red deer in rut and non-rut seasons. SOD1 expression—relative abundance of cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase mRNA; SOD2 expression—relative abundance of manganese superoxide dismutase mRNA; SOD3 expression—relative abundance of extracellular superoxide dismutase mRNA; GPx4 expression—relative abundance of glutathione peroxidase 4 mRNA; GPx5 expression—relative abundance of glutathione peroxidase 5 mRNA; CAT expression—relative abundance of catalase mRNA. The mean (±SEM) values of relative mRNA abundance are presented. a, b—significant at $p \leq 0.05$ between seasons. Values marked with * denote significant differences at $p \leq 0.05$ between the analyzed tissues in each season.

Regardless of season, the relative abundance of SOD2 mRNA was significantly ($p \leq 0.05$) higher in the testis than in the epididymis (caput, corpus, and cauda). During the rut season, the relative abundance of SOD2 mRNA was significantly higher in the caput epididymis than in the cauda epididymis.

Seasonal differences in the abundance of SOD3 mRNA were observed only in the caput epididymis. In this tissue, the relative abundance of SOD3 mRNA was significantly

($p \leq 0.05$) higher in the rut season than in the non-rut season. In both seasons, the relative abundance of SOD3 mRNA was highest in the testis, and in the rut season, significant differences in this parameter were noted between the testis and the caput epididymis, and between the caput epididymis and the corpus and cauda epididymis.

Significant seasonal variations in the relative abundance of CAT mRNA were observed in the testis and the corpus epididymis. During the rut season, the relative abundance of CAT mRNA was significantly ($p \leq 0.05$) lower in the testis and higher in the corpus epididymis than during the non-rut season. Regardless of the season, the analyzed parameter was significantly higher in the caput epididymis than in the corpus and cauda epididymis, and significantly higher in the testis than in the cauda epididymis. During the non-rut season, the relative abundance of CAT mRNA was significantly higher in the testis than in the caput epididymis.

Regardless of season, the relative abundance of GPx4 mRNA was significantly ($p \leq 0.05$) higher in the testis than in the epididymis. During the rut season, this parameter was significantly higher in the caput epididymis than in the cauda epididymis.

Significant seasonal differences in the relative abundance of GPx5 mRNA were observed in the testis and the caput epididymis. In these tissues, the analyzed parameter was significantly ($p \leq 0.05$) higher in the rut season than in the non-rut season. Regardless of season, the relative abundance of GPx5 mRNA was significantly highest in the caput epididymis. During the non-rut season, the relative abundance of GPx5 mRNA was significantly higher in the corpus epididymis than in the testis and the cauda epididymis.

2.3. Western Blot Analysis

The western blot technique was used to determine the protein content of tissues sampled from randomly selected animals ($n = 5$ in the rut season; $n = 5$ in the non-rut season) (Figure 3). Tissue samples were loaded onto gels in the same sequence. All analyzed proteins were identified. SOD1, SOD2, and SOD3 proteins were detected in all animals, which corroborates the results of gene expression and enzyme activity analyses. The results of GPx4, GPx5, and CAT protein analyses were also consistent with the gene expression data.

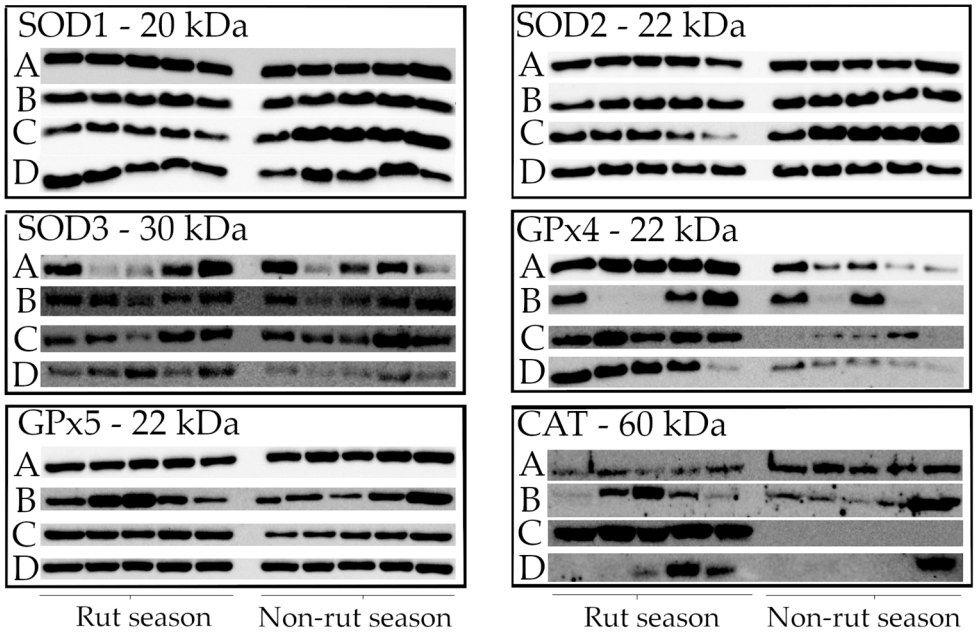


Figure 3. Western blot analysis of SOD1—cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase; SOD2—manganese superoxide dismutase; SOD3—extracellular superoxide dismutase; GPx4—glutathione

peroxidase 4; GPx5—glutathione peroxidase 5; CAT—catalase in the testis (A), caput epididymis (B), corpus epididymis (C), and cauda epididymis (D) in rut (n = 5) and non-rut (n = 5) seasons.

3. Discussion

To the best of the authors' knowledge, this is the first study to investigate the influence of rut and non-rut seasons on the antioxidant status of selected reproductive tissues in male European red deer (*Cervus elaphus elaphus*). Previous studies analyzing reproductive tract tissues were conducted on roe deer, European bison, horses, and wild boar/domestic pig hybrids [6,15,16,30]. The antioxidant status of human reproductive tissues has been investigated most extensively [34–36].

The antioxidant system prevents ROS accumulation in cells because excessive ROS production has an adverse effect on cells and leads to oxidative stress [12,31]. In all living organisms, ROS are generated during basic cellular processes, including oxidative phosphorylation in the electron transport chain [3], spermatogenesis, and sperm maturation in the epididymides [31,37]. Small amounts of ROS play important roles in the body by inducing apoptosis, stimulating glucose transport to cells, and participating in sperm hyperactivation, capacitation, and acrosome reactions [3,12,14,31]. In turn, oxidative stress can lead to protein oxidation and damage to nucleic acids, membrane phospholipids, and chromosomes [3,8,32].

In many mammalian species, the antioxidant system is composed of enzymatic and non-enzymatic antioxidants [38]. Superoxide dismutase is the key antioxidant enzyme in animals [39]. The present study revealed considerable differences in SOD activity in the testes and epididymides, and in the mRNA expression of the examined SOD isoforms between the rut season and the non-rut season. Regardless of season, substantial differences were also observed between the analyzed tissues. In the epididymis, SOD3 mRNA was more highly expressed than SOD1 and SOD2 mRNA. The expression of SOD2 and SOD3 mRNA was higher in the testis than in the epididymis. These results could indicate that SOD2 and SOD3 play a more important role in the antioxidant defense of the testes than SOD1. Similar observations were made in the reproductive tissues of European bison [6]. However, all three SOD isoforms are required for effective protection against the harmful effects of ROS [5]. In the current study, the expression of SOD2 mRNA was highest in the testis, regardless of season. Similar results were reported in a study of mice [40]. The functions of all SOD isoforms have not yet been fully explored. However, research has shown that SOD3 protects the testes and spermatozoa against lipid peroxidation. Lipid peroxidation damages sperm DNA, decreases sperm motility, and alters cell membrane permeability, thus compromising the fertilizing capacity of spermatozoa [8,14,41]. Sperm cells are particularly susceptible to lipid peroxidation because their membranes are abundant in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [14,42]. Peltola et al. [43] demonstrated that ROS are produced by Leydig cells and Sertoli cells in the testes. In addition, large amounts of ROS are generated during spermatogenesis [10]. In this case, SOD2 and SOD3 probably play a key role in enzymatic reactions that prevent ROS overproduction in the testes [6].

In the present study, similar changes in CAT and SOD activity were observed in the examined reproductive tissues. This dependency confirms that CAT breaks down H_2O_2 that is produced by SOD in cells [10,12]. Regardless of season, CAT activity was higher in the epididymides than in the testes, which could suggest that H_2O_2 produced during sperm maturation is more rapidly degraded in the epididymides than in the testes [15]. In European red deer, the expression of CAT mRNA was highest in the caput epididymis during the rut season. Similar results were reported for European bison and roe deer [6,15], as well as for rats [29]. The expression of the CAT gene was low in the testis during the rut season, which corroborates the findings of Zini and Schlegel [29], who argued that

the testes cannot directly remove H_2O_2. In this study, the expression of CAT mRNA was not correlated with CAT activity, which was also observed in the authors' previous research [6,15]. This fact can be attributed to the mechanism that regulates gene expression. Reactive oxygen species control transcription factors that regulate CAT mRNA expression and the translation of the CAT gene [44,45]. In European red deer, this mechanism could have affected the regulation of CAT mRNA expression in the testis and in the caput epididymis. Catalase was probably the primary antioxidant enzyme in these reproductive tissues.

Glutathione peroxidase also breaks down H_2O_2 in cells, but it relies on a different mechanism of action than CAT [17,18,46]. Catalase is activated in response to a high concentration of H_2O_2. Research has shown that some enzymes, including antioxidant enzymes, can be activated by oxidative bursts that may occur in the body during oxidative stress [2,17].

In this study, GPx activity peaked in the testes during the rut season, and the expression of GPx4 mRNA was higher in the testes than in the other tissues, regardless of season. Similar relationships were noted by Vernet et al. [17], Foresta et al. [47], and Koziorowska-Gilun et al. [6,15]. This observation confirms that high GPx activity can compensate for low CAT activity in the testes. In the present study, the abundance of GPx5 mRNA was much lower in the testes than in the epididymides, regardless of season. This gene was most highly expressed in the caput epididymis. Similar results were reported in studies of the male reproductive system in rats, bulls, mice, sheep, and pigs [21,32,48–50]. The expression of GPx5 mRNA was lower in the cauda epididymis than in the corpus epididymis. This finding corroborates previous observations made in sheep [32]. Glutathione peroxidase 5 is found specifically in the epididymides, and it has been identified in different segments of the epididymis in various animal species [2,18,21]. According to many researchers, seasonal changes in hormone levels influence the reproductive system in numerous animal species [51,52]. In Cerviade during the rutting period, the maximal amount of testosterone in serum and seminal plasma, large size, and intensive meiotic activity of testes have been observed by Lincoln [53], Barrell et al. [54], Roelants et al. [55], Goeritz et al. [56], and Kozioł and Koziorowski [57]. In addition, Aitken and Roman [5] found that seasonal fluctuations in hormone levels in the testes and epididymides significantly affect the activity and expression of antioxidant enzymes. Marchlewicz et al. [31] and Belleannèe et al. [58] posited that androgens indirectly regulate GPx5 expression through a tissue-specific transcription factor. In goats, testosterone enhances GPx5 expression through androgen receptors [59]. Cervids are seasonal breeders, and hormonal changes could have also influenced the expression of the GPx gene. In the current study, hormonal fluctuations could have also been responsible for significantly higher GPx5 expression in the testis and the caput epididymis during the rut season compared with that in the non-rut season. However, further research involving analyses of hormone levels is required to confirm these observations.

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Sample Collection

The testes and epididymides were obtained from 24 European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) stags that were culled during legal hunts in Nowe Ramuki Forest District (Region of Warmia and Mazury, Poland). Tissue samples for analysis were collected during the rut season (September–October, $n = 12$) and the non-rut season (December–February, $n = 12$). The samples were collected within five hours post mortem and were transported to the laboratory of the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. Tissue samples were obtained from different parts of the reproductive tract, i.e., the testis and the caput, corpus, and cauda

epididymis. For each tissue and individual, a comparable amount of material—approximately 1 cm^3—was collected, regardless of season. The collected tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at a temperature of −80 °C until further analysis. Tissue samples for gene expression analyses were preserved in TRI-Reagent solution.

4.2. Tissue Preparation

4.2.1. Antioxidant Enzyme Activity

The collected samples were homogenized in a tissue extraction buffer (50 mM Tris, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid—EDTA, 1 mM dithiothreitol—DDT, 1 µg/mL aprotinin, pH 7.5) in Lysing Matrix Tubes (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) in a FastPrep-24 apparatus (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) for 45 s to determine the activity of antioxidant enzymes. The homogenates were centrifuged at 15,000× *g* and a temperature of 4 °C for 15 min, and total protein content was determined in the Bradford assay [60]. The prepared samples were used to determine the activity of antioxidant enzymes.

4.2.2. Real-Time PCR

The tissues of the testis and epididymis (caput, corpus, and cauda) were homogenized in Lysing Matrix Tubes (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) containing 1 mL of TRI-Reagent in a FastPrep-24 apparatus (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA) for 45 s. RNA was isolated from the homogenized samples with a Total RNA Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) according to the manufacturer's protocol. RNA quality was assessed based on the 260:280 absorbance ratio.

4.2.3. Western Blot

Protein was extracted from tissues with TKM buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 25 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA). Tissues were ground in liquid nitrogen using a prechilled pestle and mortar, suspended in TKM buffer, and homogenized for 45 s. In the following step, the homogenized samples were combined with TKM buffer (1% Triton X-100) and centrifuged at 8000× *g* at a temperature of 4 °C for 10 min. The supernatants were stored at −20 °C. The total protein content of each sample was determined in the Bradford assay [60].

4.3. Sample Analyses

4.3.1. Antioxidant Enzyme Activity

The activity of the analyzed antioxidant enzymes was measured with a Beckman Coulter DU 800 spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) and expressed in U/mg of protein.

- Superoxide dismutase activity

The activity of SOD was determined with a Ransod kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK), and the samples were prepared based on the manufacturer's instructions. Superoxide dismutase activity was measured at a wavelength of 505 nm.

- Glutathione peroxidase activity

The activity of GPx was determined with a Ransel kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK), and the samples were prepared according to the manufacturer's instructions. Glutathione peroxidase activity was measured at a wavelength of 340 nm.

- Catalase activity

Catalase activity was analyzed with a Catalase Assay Kit (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Catalase activity was

determined at a wavelength of 520 nm by measuring the amount of H_2O_2 remaining after the reaction catalyzed by CAT.

4.3.2. Gene Expression

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with the RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) based on the manufacturer's instructions. In brief, 1 μg of RNA from each tissue sample was used in RT-PCR, and cDNA was synthesized in a PCR Thermal Cycler (MJ Mini Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The assay consisted of the following temperature cycles: 25 °C for 10 min, 42 °C for 60 min, and 70 °C for 5 min, followed by 4 °C. Single-stranded DNA was diluted with nuclease-free water (1:9) and used in real-time PCR.

Real-Time PCR

The obtained cDNA was used for the qPCR assay in the Real-Time PCR ABI 7900HT system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to a previously described method [6] with some modifications. The reaction mix was composed of 2 μL of the cDNA matrix, 5 μL of each primer (forward and reverse), 12.5 μL of the Maxima SYBR/ROX PCR Mix (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA), and 5.5 μL of nuclease-free water. Hot Start DNA polymerase was activated at 95 °C for 10 min. The PCR assay consisted of 40 cycles, including denaturation at 95 °C for 10 min, followed by primer annealing and elongation at 60 °C for 60 s. Each sample was assayed in duplicate. The primers were designed using Primer Express Software v 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) based on the red deer genome (Table 3). The expression of the analyzed genes (SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5, and CAT) was quantified by comparing their relative mRNA abundance with that of the reference gene (SDHA), which was selected based on its superior stability in the analyzed tissues compared with other tested reference genes, including β-actin (ACTB), GAPDH, and 18S rRNA. The expression of the analyzed genes (SOD1, SOD2, SOD3, GPx4, GPx5, and CAT) was quantified by comparing their relative mRNA abundance with that of the reference gene (SDHA). The absolute quantification of mRNA was performed using the Real Time PCR Miner algorithm [61].

Table 3. Sequences of synthetic primers applied in real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to quantify gene expression in the reproductive tissues of male European red deer. Each primer set was designed based on the accession number in the European Molecular Biology Laboratory database.

Gene	Forward Primer 5′–3′	Reverse Primer 5′–3′	Accession Number
SDHA	GACAGGAGCCCGCAGTTTT	CACGGCATCAAACTCATGGT	XM_043887904.1
SOD1	CTCCTTTTCCCCGAGTCATG	CGACGACTGTATTTCCCTTTGC	XM_043892610.1
SOD2	TCTGCAGCCTGCGTTAAAGTT	CTTCCAGCAATTCCCCTTTG	XM_043888243.1
SOD3	CGCTGCTCTGTGCCTATCTG	TGTGCATGTCGCGGATCT	XM_043870913.1
GPx4	TACGCCGAGTGTGGTTTACG	GCGGCGAACTCTTTGATCTC	XM_043912658.1
GPx5	TGACATCCGCTGGAATTTTG	ACTGACGGGAGTCCGATGAA	XM_043908264.1
CAT	TGCCCTATTGTTTCCGTCCTT	ACCATGTCCGGATCCTTCAG	XM_043909065.1

SDHA—reference gene, succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A; SOD1—cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase; SOD2—manganese superoxide dismutase; SOD3—extracellular superoxide dismutase; GPx4—glutathione peroxidase 4; GPx5—glutathione peroxidase 5; CAT—catalase.

4.3.3. Western Blot

SDS-PAGE

Electrophoresis was conducted on a 15% polyacrylamide gel with SDS [62] in a Mini-Protean II Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using a Tris-Glycine buffer (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3). Each sample contained 20 μg of protein and 2 μL of a loading buffer (1 M Tris-HCl, 20% SDS, 20% glycerol, 2% β-mercaptoethanol, 2% bromophenol blue, pH 6.8). The prepared samples were loaded into wells.

Semi-Dry Protein Transfer

The separated proteins were transferred to an Immobilon-P polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane in the Pierce Power Blot system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The membrane was blocked overnight with 5% skim milk powder in TBS-T buffer (1 M Tris, 5 M NaCl, 0.05% (*v*/*v*) Tween 20) at a temperature of 4 °C.

Antibody Incubation

The analyzed proteins were identified using the following primary antibodies:

- Rabbit polyclonal anti-SOD1 antibody (1:10,000; PA5-23245; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- Rabbit anti-SOD2 polyclonal antibody (1:1000; PA1-31072; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- Rabbit polyclonal anti-SOD3 antibody (1:1000; PA5-93329; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- Rabbit polyclonal anti-GPx4 antibody (1:1000; ab41787; Abcam, Cambridge, UK);
- Rabbit polyclonal anti-GPx5 antibody (1:500; PA5-102342; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- Rabbit polyclonal anti-CAT antibody (1:15,000; 200-401-051; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA);
- Mouse monoclonal anti-beta actin (C4) antibody (1:200; sc-47778; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

The membranes were incubated overnight with primary antibodies at a temperature of 4 °C. After incubation, the membranes were rinsed and incubated with goat anti-rabbit IgG secondary antibodies conjugated to HRP (1:15,000; sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) for 1 h at room temperature. Protein bands were visualized by chemiluminescent detection in the ChemiDoc imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with the SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate.

4.4. Statistical Analysis

The results were processed statistically in the Statistica v. 14.1.0.4 program (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The normality of data distribution was checked via the Shapiro–Wilk test. Non-normally distributed data were transformed with the Box–Cox transformation. The effect of season on the studied parameters was compared by one-way analysis of variance (ANOVA). The significance level ($p \leq 0.05$) was adjusted via the Bonferroni post hoc test. The results were expressed as mean values ± SEM.

5. Conclusions

In summary, the present study revealed considerable differences in the activity and mRNA expression of antioxidant enzymes in the reproductive tissues of male European red deer between the rut season (September-October) and the non-rut season (December-February). In addition, this study demonstrated that the key antioxidant enzymes—SOD, GPx, and CAT—participated in the antioxidant defense system of reproductive tissues in European red deer stags in both examined periods, particularly during the rut season. Considering the specific hormonal regulation in cervids, characterized by a surge in

testosterone levels during the rutting season, it can be assumed that the observed changes in the activity as well as mRNA and protein levels of the studied antioxidant enzymes are related to fluctuations in sex hormone concentrations between the rutting and non-rutting periods. However, further research is needed to expand our understanding of the antioxidant defense system in the reproductive tract of European red deer.

Author Contributions: Conceptualization, N.M.N. and A.D.; methodology, N.M.N., A.D., and P.G.; formal analysis, N.M.N. and M.K.-G.; resources, P.J.; writing—original draft preparation, N.M.N.; writing—review and editing, A.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was funded by the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (project No. 11.610.003-110) and funded by the Minister of Science under "the Regional Initiative of Excellence Program".

Institutional Review Board Statement: Biological material (testicles and epididymides) was collected post mortem from male European red deer (*Cervus elaphus elaphus*) obtained during legal, routine hunts in accordance with the Annual Game Management Plan approved by the Regional Directorate of State Forest (Region of Warmia and Mazury, Poland). The animals were not killed specifically for research purposes, nor did they undergo any experimental procedures prior to death. Sampling only took place after death and did not involve any interventions during the animals' lives or at the time of slaughter. In accordance with the Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes (Article 2 (1) (6) and Article 3b of the [63]), to which the Resolution No. 12/2022 of the National (Polish) Ethics Committee for Animal Experiments, dated 11 March 2022 also refers, research based exclusively on post mortem material obtained from wild animals that were neither held in captivity nor subjected to experimental procedures did not require the approval of the local ethics committee for experiments on animals. A hunting license was obtained for the needs of this research.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Tissue samples for this study were obtained under a scientific cooperation agreement between the University of Warmia and Mazury in Olsztyn and Nowe Ramuki Forest District. The authors would like to thank the employees of Nowe Ramuki Forest Inspectorate, especially K. Zdun, as well as other hunters, for their assistance in sample collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Agarwal, A.; Gupta, S.; Sharma, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2005**, *3*, 28. https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28.
2. Chabory, E.; Damon, C.; Lenoir, A.; Henry-Berger, J.; Vernet, P.; Cadet, R.; Saez, F.; Drevet, J.R. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 1321–1331. https://doi.org/10.2527/jas.2009-2583.
3. Łuszczewski, A.; Matyska-Piekarska, E.; Trefler, J.; Wawer, I.; Łącki, J.; Śliwińska-Stańczyk, P. Reaktywne formy tlenu—Znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* **2007**, *45*, 284–289.
4. Frączek, M.; Kurpisz, M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2005**, *59*, 523–534.
5. Aitken, R.J.; Roman, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2008**, *1*, 15–24. https://doi.org/10.4161/oxim.1.1.6843.

6. Koziorowska-Gilun, M.; Gilun, P.; Fraser, L.; Koziorowski, M.; Kordan, W.; Stefanczyk-Krzymowska, S. Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in reproductive tract of adult male European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758). *Reprod. Domest. Anim.* **2013**, *48*, 7–14. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02015.x.
7. Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M.A.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R.; Ruiz, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* **2004**, *62*, 690–701. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.013.
8. Perumal, P. Effect of Superoxide Dismutase on Semen Parameters and Antioxidant Enzyme Activities of Liquid Stored (5 °C) Mithun (*Bos frontalis*) Semen. *J. Anim.* **2014**, *2014*, 821954. https://doi.org/10.1155/2014/821954.
9. Peeker, R.; Abramsson, L.; Marklund, S.L. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* **1997**, *3*, 1061–1066. https://doi.org/10.1093/molehr/3.12.1061.
10. Mruk, D.D.; Silvestini, B.; Mo, M.Y.; Cheng, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase—A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* **2002**, *65*, 305–311. https://doi.org/10.1016/s0010-7824(01)00320-1.
11. Castellini, C.; D'Andrea, S.; Cordeschi, G.; Totaro, M.; Parisi, A.; Di Emidio, G.; Tatone, C.; Francavilla, S.; Barbonetti, A. Pathophysiology of Mitochondrial Dysfunction in Human Spermatozoa: Focus on Energetic Metabolism, Oxidative Stress and Apoptosis. *Antioxidants* **2021**, *10*, 695. https://doi.org/10.3390/antiox10050695.
12. Gotowiecka, M.; Niżański, W.; Partyka, A.; Strzeżek, R.; Koziorowska-Gilun, M. Ocena wpływu stresu oksydacyjnego na nasienie zwierząt. *Med. Weter.* **2015**, *71*, 743–747.
13. Ścibor, D.; Czeczot, H. Katalaza-budowa, właściwości, funkcje. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2006**, *60*, 170–180.
14. Kankofer, M.; Kolm, G.; Aurich, J.; Aurich, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* **2005**, *63*, 1354–1365. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.005.
15. Koziorowska-Gilun, M.; Fraser, L.; Gilun, P.; Koziorowski, M.; Kordan, W. Activity of antioxidant enzymes and their mRNA expression in different reproductive tract tissues of the male roe deer (*Capreolus capreolus*) during the pre-rut and rut season. *Small Rumin. Res.* **2015**, *129*, 97–103. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.05.006.
16. Koziorowska-Gilun, M.; Gilun, P.; Mietelska, K.; Kordan, W. Determination of the activity and relative abundance of mRNA for antioxidant enzymes in stallion testicular and epididymal tissues: A comparison between two breeding seasons. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *196*, 230–238. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.015.
17. Vernet, P.; Aitken, R.J.; Drevet, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2004**, *216*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069.
18. Drevet, J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *250*, 70–79. https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.027.
19. Brigelius-Flohé, R.; Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subjects* **2013**, *1830*, 3289–3303. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
20. Imai, H.; Suzuki, K.; Ishizaka, K.; Ichinose, S.; Oshima, H.; Okayasu, I.; Emoto, K.; Umera, M.; Nakagawa, Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.* **2001**, *64*, 674–683. https://doi.org/10.1095/biolreprod64.2.674.
21. Grignard, E.; Morin, J.; Vernet, P.; Drevet, J.R. GPx5 orthologs of the mouse epididymis-restricted and sperm-bound selenium-independent glutathione peroxidase are not expressed with the same quantitative and spatial characteristics in large domestic animals. *Theriogenology* **2005**, *64*, 1016–1033. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.008.
22. Barranco, I.; Tvarijonaviciute, A.; Perez-Patiño, C.; Vicente-Carrillo, A.; Parrilla, I.; Ceron, J.J.; Martinez, E.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Roca, J. Glutathione Peroxidase 5 Is Expressed by the Entire Pig Male Genital Tract and Once in the Seminal Plasma Contributes to Sperm Survival and In Vivo Fertility. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162958. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162958.
23. Kuba, J.; Landete-Castillejos, T.; Udala, J. Red deer farming: Breeding practice, trends and potential in Poland—A review. *Ann. Anim. Sci.* **2015**, *15*, 591–599. https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0033.
24. Garcia, F.; Silva, A.A.; Freitas, H.; Sousa, J.P.; Alves, J. The essential, but complex, role of red deer as an ecosystem service provider: A comprehensive review across Europe. *Eur. J. Wildl. Res.* **2025**, *71*, 46. https://doi.org/10.1007/s10344-025-01922-7.
25. Millán, M.; Carranza, J.; Seoane, J.M.; Pérez-González, J. Forage quality of consecutive years interact to affect body condition, reproductive rate and rut phenology in Iberian red deer. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0278367. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278367.
26. Srivastava, T.; Hameed, J.; Kumar, V.; Segu, H.; Narayan, S.; John, M.; Vasudevan, K.; Umapathy, G. Establishing reproductive seasons for the conservation of the critically endangered Kashmir red deer *Cervus Hanglu*. *Sci. Rep.* **2025**, *15*, 4955. https://doi.org/10.1038/s41598-025-89244-1.

27. Giżejewski, Z.; Snochowski, M.; Mayntz, M. Fractions of the semen of red deer (*Cervus elaphus*)—Their occurrence and characteristics in different periods of season. *Pol. J. Vet. Sci*. **2003**, *6*, 219–223.
28. Marti, E.; Mara, L.; Marti, J.I.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* **2007**, *67*, 1446–1454. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.002.
29. Zini, A.; Schlegel, P.N. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J. Androl.* **1996**, *17*, 473–480.
30. Dziekońska, A.; Fraser, L.; Koziorowska-Gilun, M.; Strzezek, J.; Koziorowski, M.; Kordan, W. Seasonal-dependent variations in metabolic status of spermatozoa and antioxidant enzyme activity in the reproductive tract fluids of wild boar/domestic pig hybrids. *Pol. J. Vet. Sci.* **2014**, *17*, 307–313. https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0042.
31. Marchlewicz, M.; Szypulska-Koziarska, D.; Grzegrzółka, A.; Kruk, J.; Duchnik, E.; Wiszniewska, B. Ochrona przed stresem oksydacyjnym w męskim układzie płciowym. *Pomeranian J. Life Sci.* **2016**, *62*, 44–52. https://doi.org/10.21164/pomjlifesci.169.
32. Li, R.; Fan, X.; Zhang, T.; Song, H.; Bian, X.; Nai, R.; Li, J.; Zhang, J. Expression of selenium-independent glutathione peroxidase 5 (GPx5) in the epididymis of Small Tail Han sheep. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2018**, *31*, 1591–1597. https://doi.org/10.5713/ajas.18.0015.
33. Lecewicz, M.; Majewska, A.; Kordan, W.; Wysocki, P.; Koziorowska-Gilun, M. Changes in the expression of selected antioxidative proteins in roe deer (*Capreolus capreolus*) epididymis in different periods of the rutting season. *Ann. Anim. Sci.* **2017**, *17*, 423–431. https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0052.
34. Nonogaki, T.; Noda, Y.; Narimoto, K.; Shiotani, M.; Mori, T.; Matsuda, T.; Yoshida, O. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum. Reprod.* **1992**, *7*, 81–85. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137565.
35. Williams, K.; Frayne, J.; McLaughlin, E.; Hall, L. Expression of extracellular superoxide dismutase in the human reproductive tract, detected using antisera against a recombinant protein. *Mol. Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 235–242.
36. Taylor, C.T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Env. Toxic. Pharmac.* **2001**, *10*, 189–198. https://doi.org/10.1016/S1382-6689(01)00099-0.
37. Aitken, R.J.; Vernet, P. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1998**, *53*, 109–118.
38. Agarwal, A.; Saleh, R.A.; Bedaiwy, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* **2003**, *79*, 829–843. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04948-8.
39. Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L.; Storey, B.T. Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa Superoxide Dismutase as Major Enzyme Protectant against Oxygen Toxicity. *J. Androl.* **1987**, *8*, 338–348. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1987.tb00973.x.
40. Jones, P.L.; Kucera, G.; Gordon, H.; Boss, J.M. Cloning and characterization of the murine manganous superoxide dismutase-encoding gene. *Gene* **1995**, *153*, 155–161. https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00666-g.
41. Partyka, A.; Łukaszewicz, E.; Niżański, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* **2012**, *77*, 1497–1504. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006.
42. Reglero, M.M.; Taggart, M.A.; Castellanos, P.; Mateo, R. Reduced sperm quality in relation to oxidative stress in red deer from a lead mining area. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 2209–2215. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.017.
43. Peltola, V.; Huhtaniemi, I.; Metsa-Ketela, T.; Ahotupa, M. Induction of lipid peroxidation during steroidogenesis in the rat testis. *Endocrin.* **1996**, *137*, 105–112. https://doi.org/10.1210/endo.137.1.8536600.
44. Lambertucci, R.H.; Levada-Pires, A.C.; Rossoni, L.V.; Curi, R.; Pithon-Curi, T.C. Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech. Ageing. Dev.* **2007**, *128*, 267–275. https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.12.006.
45. Quan, X.; Lim, S.-O.; Jung, G. Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG Island in the Oct-1 promoter. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3436–3441. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.035.
46. Noblanc, A.; Peltier, M.; Damon-Soubeyrand, C.H.; Kerchkove, N.; Chabory, E.; Vernet, P.; Saez, F.; Cadet, R.; Janny, L.; Pons-Rejraji, H.; et al. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 38565. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038565.
47. Foresta, C.; Flohe, L.; Garolla, A.; Roveri, A.; Ursini, F.; Maiorino, M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol. Reprod.* **2002**, *67*, 967–971. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.003822.
48. Okamura, N.; Iwaki, Y.; Hiramoto, S.; Tamba, M.; Bannai, S.; Sugita, Y.; Syntin, P.; Dacheux, F.; Dacheux, J.L. Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1336*, 99–109. https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00016-0.
49. Williams, K.; Frayne, J.; Hall, L. Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Mol. Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 841–848. https://doi.org/10.1093/molehr/4.9.841.

50. Belleannée, C.; Labas, V.; Teixeira-Gomes, A.P.; Gatti, J.L.; Dacheux, J.L.; Dacheux, F. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J. Proteom.* **2011**, *74*, 59–78. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.013.
51. Gerlach, T.; Aurich, J. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *58*, 197–213. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(99)00093-7.
52. Martinez-Pastor, F.; Guerra, C.; Kaabi, M.; Garcia-Macias, V.; de Paz, P.; Alvarez, M.; Herraez, P.; Anel, L. Season effect on genitalia and epididymal sperm from Iberian red deer, roe deer and Cantabrian chamois. *Theriogenology* **2005**, *63*, 1857–1875. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.006.
53. Lincoln, G. The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *J. Zool.* **2010**, *163*, 105–123. https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1971.tb04527.x.
54. Barrell, G.K.; Muir, P.D.; Sykes, A.R. Seasonal Profiles of Plasma Testosterone, Prolactin and Growth Hormone in Red Deer Stags. In *Biology of Deer Production*; Bulletin 22; The Royal Society of New Zealand: Wellington, New Zealand, 1985; pp. 135–190.
55. Roelants, H.; Schneider, F.; Göritz, F.; Streich, J.; Blottner, S. Seasonal changes of spermatogonial proliferation in roe deer, demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and testosterone. *Biol. Reprod*. **2002**, *67*, 305–312. https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.305.
56. Goeritz, F.; Quest, M.; Wagener, A.; Fassbender, M.; Broich, A.; Hildebrandt, T.B.; Hofmann, R.R.; Blottner, S. Seasonal timing of sperm production in roe deer: Interrelationship between changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology* **2003**, *59*, 1487–1502. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01201-3.
57. Kozioł, K.; Koziorowski, M. Steroid hormones in peripheral blood plasma and androgen receptors in testis and epididymis of roe deer male (*Capreolus capreolus*) during the reproduction season. *Small Rumin. Res.* **2013**, *115*, 86–93. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.09.008.
58. Belleannèe, C.; Thimon, V.; Sullivan, R. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell. Tissue Res.* **2012**, *349*, 717–731. https://doi.org/10.1007/s00441-012-1381-0.
59. Luan, Z.; Fan, X.; Song, H.; Li, R.; Zhang, W.; Zhang, J. Testosterone promotes GPX5 expression of goat epididymal epithelial cells cultured in vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* **2019**, *55*, 677–685. https://doi.org/10.1007/s11626-019-00391-y.
60. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **1976**, *7*, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
61. Zhao, S.; Fernald, R. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* **2005**, *12*, 1045–1062. https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047.
62. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0.
63. Sip Lex. Available online: https://sip.lex.pl/akty-prawne/dzu-dziennik-ustaw/ochrona-zwierzat-wykorzystywanych-do-celow-naukowych-lub-edukacyjnych-18169618 (accessed on 9 July 2025).

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Olsztyn, 27.07.2025

Nicoletta Magdalena Neuman
(imię i nazwisko kandydata)

Zootechnika i Rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy: **Neuman N.M., Gilun P., Koziorowska-Gilun M., Janiszewski P., Dziekońska A. 2025, Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in the Reproductive Tissues of Male European Red Deer (*Cervus elaphus elaphus*). International Journal of Molecular Sciences, 26, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Neuman Nicoletta
(podpis kandydata)

Olsztyn, 27.07.2025

Dr Przemysław Gilun
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Gilun P., Koziorowska-Gilun M., Janiszewski P., Dziekońska A. 2025, Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in the Reproductive Tissues of Male European Red Deer (*Cervus elaphus elaphus*). International Journal of Molecular Sciences, 26, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu metodyki badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Przemysław Gilun

.....
podpis/podpisy

Olsztyn, 27.07.2025

dr hab. wet. Magdalena Koziorowska-Gilun, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Gilun P., Koziorowska-Gilun M., Janiszewski P., Dziekońska A. 2025, Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in the Reproductive Tissues of Male European Red Deer (*Cervus elaphus elaphus*). International Journal of Molecular Sciences, 26, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: wykonaniu analiz laboratoryjnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Magdalena Koziorowska-Gilun

.....
podpis/podpisy

Olsztyn, 27.07.2025

prof. dr hab. inż. Paweł Janiszewski
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Gilun P., Koziorowska-Gilun M., Janiszewski P., Dziekońska A. 2025, Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in the Reproductive Tissues of Male European Red Deer (*Cervus elaphus elaphus*). International Journal of Molecular Sciences, 26, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: dostarczeniu materiału do badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Janiszewski Paweł
.....
podpis/podpisy

Olsztyn, 22.03.2026

dr hab. Anna Dziekońska, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Dorota Witkowska

OŚWIADCZENIE
współautora/współautorów

Oświadczam, że w pracy pod tytułem **Neuman N.M., Gilun P., Koziorowska-Gilun M., Janiszewski P., Dziekońska A. 2025, Antioxidant Enzyme Activity and mRNA Expression in the Reproductive Tissues of Male European Red Deer (*Cervus elaphus elaphus*). International Journal of Molecular Sciences, 26, 7221. https://doi.org/10.3390/ijms26157221** mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji badań oraz ich metodyki, pisaniu, recenzowaniu i edytowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Nicolettę Magdalenę Neuman jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Nicoletty Magdaleny Neuman polegający na opracowywaniu koncepcji i metodyki badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

Anna Dziekońska
.....
podpis/podpisy