

Stężenie wolnego testosteronu (FT) w surowicy żubrów z wczesną spermiogenezą – badania wstępne

Elżbieta Czykier

Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Serum concentration of free testosterone (FT) in European bison with early spermiogenesis – a preliminary study

Abstract: The aim of the study was to estimate the dynamics of free testosterone concentrations in the blood serum of the European bison *Bison bonasus* (Linnaeus, 1758) with early spermiogenesis in 3 age classes, using the program Statistica. Blood serum collected from 77 European bison specimens, culled in the autumn and winter seasons in the Białowieża Forest, in the years 1998–2003 was used for analysis. Serum free testosterone levels were determined by the ELISA No RE 52171 method of IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES. We found moderate and high serum concentrations of free testosterone in European bison with early spermiogenesis in their age class. However, the mean free testosterone levels in European bison with early spermiogenesis did not differ statistically significantly from those observed in the remaining animals in a respective age class.

Key words: European bison, early spermiogenesis, free testosterone, blood serum

Wstęp

Badania morfologiczne jąder samców żubra *Bison bonasus* (Linnaeus, 1758) prowadzone w latach 1969–1993 wykazały, że żubry rozpoczynają spermatogenezę w wieku 4 lat (Czykier i in. 1999). Kontynuacja tych badań w latach 1998–2003 pozwoliła na stwierdzenie, że pojedyncze osobniki w wieku 2 czy 3 lat wykazują spermiogenezę, obecność zaś spermatyd w kanalikach krętych jąder stwierdzono już u żubrów w wieku 8 i 10 miesięcy (Czykier, Krasieńska 2004). Podobne wyniki uzyskali inni badacze zarówno na podstawie bezpośrednich obserwacji samców, jak i analizy danych rodowodowych z Księgi Rodowodowej Żubrów, które wykazały, że samce w wieku 15–20 miesięcy skutecznie kryły żubrzyce w warunkach hodowli zamkniętej (Zablocki 1949; Mohr 1952, Jaczewski 1958). Również Bomba (1999) wykazała obecność plemników w obrazie z mikroskopu elektronowego u jednego półtorarocznego samca. Jednak przypadki wczesnej spermiogenezy u cieląt są zjawiskiem odosobnionym. Dotyczą one tylko pojedynczych osobników, są cechą osobniczą, indywidualną, spowodowaną przez aktualny stan fizjologiczny zwierzęcia.

Wczesne rozpoczynanie spermiogenezy obserwowano u żubra rzadko. Spośród 95 analizowanych samców (w poprzednich badaniach) tylko u 11 zwierząt obserwowano wczesną spermiogenezę o różnym stopniu zaawansowania tego procesu (Czykier i in. 1999; Czykier, Krasieńska 2004), przy czym wczesna spermiogeneza występowała zarówno wśród zwierząt żyjących w stadzie wolnym, jak i w hodowli zamkniętej (Czykier i in. 1999; Czykier, Krasieńska 2004). U samców głównym hormonem pobudzającym spermatogenezę w kanalikach krętych jąder jest testosteron (TT). U mężczyzn ponad 97% wydzielanego testosteronu jest związane z białkami osocza. Jedynie niewielka część testosteronu, stanowiąca 0,5–3%, nie jest połączona z białkami i jest to wolny testosteron (FT) występujący w osoczu. Jest on biologicznie aktywny, przenika do komórek narządów docelowych i wywołuje efekty biologiczne. Postanowiono zatem ocenić, jakie stężenia wolnego testosteronu występują w surowicy żubrów z wczesną spermiogenezą w stosunku do zwierząt bez wczesnej spermiogenezy, będących w tej samej klasie wiekowej.

Materiał i metody

Do badań użyto surowicy 77 żubrów, pobranej od zwierząt odstrzelonych w sezonach jesienno-zimowych (po zakończeniu okresu rujowego) (Krasieński, Raczyński 1967) w latach 1998–2003 na terenie Puszczy Białowieskiej. Eliminacje były dokonywane w celu redukcji liczebności populacji. Przyczyny wyboru konkretnych osobników do eliminacji były różne, np. choroby, ze szczególnym uwzględnieniem nekrotycznego zapalenia napletka samców (NZN), zła kondycja, wady eksterierowe, urazy różnego pochodzenia, agresja w stosunku do człowieka czy starość (Krasieńska, Krasieński 2007). Wiek żubrów pochodzących z wolno żyjącej populacji był określany przez Z. A. Krasieńskiego (BPN) na podstawie wyrzynania się zębów mlecznych oraz wymiany zębów mlecznych na stałe (Węgrzyn, Serwatka 1984). Odstrzały żubrów przeprowadzano w godzinach przedpołudniowych. Pobierano pełną krew z tętnicy udowej zwierząt (*post mortem*), a następnie odwirowywano surowice w Zakładzie Badania Ssaków Polskiej Akademii Nauk w Białowieży. Próbkę surowic mrożono i przechowywano w temperaturze -20°C . Poziom wolnego testosteronu No RE 52171 w surowicy samców żubra oznaczono metodą ELISA firmy IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES z Hamburga w Niemczech, charakteryzującą się wysoką czułością i pozwalającą określić stężenia wolnego testosteronu rzędu 0,15 pg/ml. Podobnie jak w poprzednich pracach zwierzęta podzielono na następujące klasy wiekowe: klasa I – cielęta do 1 roku, klasa II – młodzież w wieku do 2 lat, klasa III – młode samce w wieku do 3 lat (Czykier, Krasieńska 2004). Jako kryterium wczesnej spermiogenezy przyjęto obecność plemników w kanalikach krętych jąder i/lub obecność plemników w przewodzie najądrza (Czykier, Krasieńska 2004). Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono z wykorzysta-

taniem programu Statistica. Ponieważ rozkład badanych cech nie był zgodny z rozkładem normalnym (co wykazał test Shapiro-Wilka) oraz liczba jednocześnie porównywanych grup była większa od dwóch, do analizy zastosowano test Kruskala-Wallisa, a następnie test U Mann-Whitney.

Wyniki i dyskusja

Cielęta w wieku do 1 roku

W badanej grupie zwierząt, liczącej 47 żubrów, były 2 osobniki Podbój 8781 i Policzny 8778 (w wieku 8 i 10 miesięcy) pochodzące z hodowli zamkniętej, u których stwierdzono obecność spermatyd w nabłonku plemnikotwórczym kanalików krętych jąder. Stężenie wolnego testosteronu w surowicy 8-miesięcznego samca wynosiło 19 pg/ml, u 10-miesięcznego zaś 29 pg/ml (tab. 1). Średnia wartość FT u obu tych zwierząt wynosiła $24,000 \pm 7,071$ pg/ml i była niższa, niż u pozostałych 45 osobników w tej klasie wiekowej, dla których wynosiła $42,505 \pm 39,400$ pg/ml, przy czym nie była to różnica istotna statystycznie ($p < 0,712$). W tej klasie wiekowej stężenia wolnego testosteronu w surowicy cieląt wahały się od 0,2 pg/ml do 101 pg/ml (tab. 1).

Tabela 1. Stężenia wolnego testosteronu w surowicy żubrów w I klasie wiekowej (do 1 roku).

Lp.	Numer żubra	Wiek [miesiące]	Plemniki	Wolny testosteron [pg/ml]
1	Posz 9736	4	–	0,2
2	1474	5	–	6,54
3	1559	5	–	36
4	1560	5	–	55
5	1525	5	–	8,26
6	Powar 9406	6	–	2,09
7	Pogromca 9408	6	–	2,9
8	1561	6	–	65
9	Porion 9548	8	–	28
10	Podnik 8783	7	–	52
11	1558	7	–	93,9
12	1384/552	7	–	2,9
13	Podolny 9727	7	–	53
14	1639	7	–	24
15	Podbój 8781	8	spermatydy	19
16	1475	8	–	90,2
17	1641	8	–	38

18	1640	8	–	80
19	1382	9	–	92
20	1476	9	–	100
21	1383/550	9	–	101
22	1524	9	–	84,6
23	1642	9	–	54
24	Policzny 8778	10	spermatydy	29
25	1562	6	–	50
26	1379/535	5	–	0,5
27	Podgrzybek 8322	5	–	160
28	1293/432	3	–	0,4
29	1376	5	–	2,5
30	1345	12	–	20
31	1373	5	–	9,24
32	1372	6	–	28,54
33	1154/357	8	–	91
34	1381	5	–	9,61
35	Pomiot 8786	4	–	0,4
36	Powiat 7840	11	–	51,3
37	1238	7	–	30,22
38	1322	7	–	5,34
39	1324	7	–	3,06
40	1326/464	8	–	91,8
41	1323/445	7	–	83,97
42	1320/442	5	–	43,21
43	1292/431	4	–	0,47
44	1319/449	3	–	2,86
45	1343	2	–	5,89
46	1371	5	–	6,1
47	Powód	6	–	84

Młodzież w wieku do 2 lat

W tej grupie zwierząt, liczącej 21 żubrów, u 4 osobników (z wczesną spermioogenezą) obserwowano następujące stężenia wolnego testosteronu: u dwóch 18-miesięcznych ze stada wolnego 70,76 pg/ml i 10,16 pg/ml,

u 24-miesięcznego ze stada wolnego 78 pg/ml, i u 24-miesięcznego z hodowli zamkniętej 47 pg/ml (tab. 2). Średnie stężenie wolnego testosteronu u 4 osobników z wczesną spermiogenezą było wyższe ($51,480 \pm 30,564$ pg/ml), aniżeli u pozostałych 17 zwierząt ($31,461 \pm 33,084$ pg/ml), przy czym nie były to różnice istotne statystycznie ($p < 0,370$). Stężenia wolnego testosteronu w surowicy żubrów w tej klasie wiekowej wahały się od 2,7 pg/ml do 96,2 pg/ml (tab. 2).

Tabela 2. Stężenia wolnego testosteronu w surowicy żubrów w II klasie wiekowej (do 2 roku).

Lp.	Numer żubra	Wiek [miesiące]	Plemniki	Wolny testosteron [pg/ml]
1	1478	24	–	68,62
2	1385	18	obecne	70,76
3	1565	18	obecne	10,16
4	1477	18	–	9,36
5	1564	18	–	13
6	1567	24	obecne	78
7	1386	24	–	2,7
8	1387	24	–	12,4
9	1388	24	–	12,52
10	1433	24	–	12
11	1526	24	–	96,2
12	1480	24	–	92
13	1479	24	–	74
14	1528	24	–	22,5
15	Potomak 9176	24	obecne	47
16	1341	18	–	19,95
17	1199/405	18	–	88,1
18	1241	24	–	4,85
19	1243/483	24	–	25,64
20	1240/430	24	–	28,54
21	1344/541	24	–	15,18

Młode samce w wieku do 3 lat

W tej grupie, liczącej 7 zwierząt, u 3 osobników z wczesną spermiogenezą stwierdzono następujące stężenia wolnego testosteronu w surowicy: u 26-miesięcznego z hodowli zamkniętej 18 pg/ml oraz u dwóch 36-miesięcznych ze stada wolnego 11,5 pg/ml i 72 pg/ml (tab. 3). Średnie stężenie FT u tych

3 zwierząt było nieznacznie wyższe ($33,833 \pm 33,213$ pg/ml), aniżeli u pozostałych 4 osobników bez wczesnej spermiogenezy ($29,725 \pm 35,358$ pg/ml), przy czym nie były to różnice istotne statystycznie ($p < 0,724$). Stężenia wolnego testosteronu w surowicy żubrów w tej klasie wiekowej wahały się od 0,9 pg/ml do 80 pg/ml (tab. 3).

Tabela 3. Stężenia wolnego testosteronu w surowicy żubrów w III klasie wiekowej (do 3. roku).

Lp.	Numer żubra	Wiek [miesiące]	Plemniki	Wolny testosteron [pg/ml]
1	Pozór 8950	26	obecne	18
2	Poloniusz 8572	27	–	10
3	1435	36	obecne	11,5
4	1390	36	obecne	72
5	1347	36	–	0,9
6	1434	36	–	80
7	1246	36	–	28

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że żubry z wczesną spermiogenezą z II i III klasy wiekowej mają nieznacznie wyższe średnie wartości wolnego testosteronu w surowicy w stosunku do pozostałych zwierząt w tych samych klasach wiekowych, jednak nie były to różnice istotne statystycznie, natomiast w I klasie wiekowej średnie wartości FT u dwóch osobników z wczesną spermiogenezą były niższe aniżeli u pozostałych zwierząt w tej klasie wiekowej, przy czym również nie były to różnice istotne statystycznie. Obecne badanie wykazało również, że żubry z wczesną spermiogenezą mają średnie i wysokie stężenia FT w surowicy, w stosunku do pozostałych zwierząt w danej klasie wiekowej. Ponadto u wszystkich badanych żubrów zaobserwowano bardzo duże różnice indywidualne w stężeniach FT w surowicy między poszczególnymi osobnikami. Tę prawidłowość stwierdzili również inni autorzy (Gill 1999; Czykier, Krasieńska 2006). Mimo dużych wahań między najniższymi a najwyższymi stężeniami wolnego testosteronu w surowicy w badanych trzech klasach wiekowych nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach FT w surowicy między żubrami z hodowli a pochodzącymi ze stada wolnego. Dużą trudność w ocenie stężeń FT w surowicy żubrów z wczesną spermiogenezą stanowi brak wartości referencyjnych dla hormonów płciowych w surowicy dla tego gatunku. Po analizie stężenia FT u zwierząt z wczesną spermiogenezą wydaje się, że dominującą rolę w procesie zapoczątkowania spermatogenezy i syntezy testosteronu odgrywają czynniki genetyczne.

Literatura

- Bomba G. 1995. Badanie patomorfologiczne jąder żubroni. Rozprawa doktorska. Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie [In Polish]. 1–90.
- Czykier E., Sawicki B., Krasieńska M. 1999. Postnatal development of the European bison spermatogenesis. *Acta Theriol.* 44: 77–90.
- Czykier E., Krasieńska M. 2004. Cases of spermiogenesis in young European bison. *Acta Theriol.* 49: 543–691.
- Czykier E., Krasieńska M. 2006. Stężenie wolnego testosteronu w surowicy samców żubra (*Bison bonasus*) w zależności od wieku, masy ciała i masy jąder-badanie wstępne. *Parki nar. Rez. Przyr.* 25: 119–131.
- Gill J. 1999. Zarys fizjologii żubra. Wydawnictwo Severus, Warszawa: 42–60.
- Jaczewski Z. 1958. Reproduction of the European bison, *Bison bonasus* (L.) in reserves. *Acta Theriol.* 1: 333–376.
- Krasieńska M., Krasieński Z.A. 2007. European bison. The Nature Monograph. Mammal Research Institute, Białowieża 1–317.
- Krasieński Z., Raczyński J. 1967. The reproduction biology of European bison living in reserves and freedom. *Acta Theriol.* 12: 407–444.
- Mohr E. 1952. Der Wisent. Die Neue Brehm-Bcherei 74: 1–74.
- Węgrzyn M., Serwatka S. 1984. Teeth eruption in the European bison. *Acta Theriol.* 29: 111–121.
- Zablocki M.A. 1949. Neobkhodimost izuchenya osobennosti zubra i ego vosstanovlene v SSSR. *Nauchno-Metodicheskie Zapiski* 13: 128–1146.