



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
w Lublinie



WYDZIAŁ
BIOLOGII, NAUK O ZWIERZĘTACH
I BIOGOSPODARKI

mgr inż. Milena Anna Bajda

**Obraz morfologiczny oraz wskaźniki biochemiczne wybranych
tkanek matek pszczoły miodnej w zależności
od wieku i statusu reprodukcyjnego**

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Lublin, 2017

mgr inż. Milena Anna Bajda

**Obraz morfologiczny oraz wskaźniki biochemiczne wybranych
tkanek matek pszczoły miodnej w zależności
od wieku i statusu reprodukcyjnego**

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Biologicznych Podstaw
Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

PROMOTOR:

dr hab. Krzysztof Olszewski

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr hab. Aneta Strachecka

RECENZENCI:

Dr hab. Beata Madras-Majewska, prof. nadzw.
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Dr hab. Monika Fliszkiewicz
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Lublin, 2017

Spis treści

1.	WSTĘP	5
2.	HIPOTEZY BADAWCZE	6
3.	CEL PRACY	7
4.	METODYKA.....	7
5.	WYNIKI	13
6.	PODSUMOWANIE.....	38
7.	WNIOSKI	38

1. WSTĘP

Pszczoły miodne to owady żyjące w dwóch środowiskach, w gnieździe, którego warunki ściśle kontrolują oraz w zmiennych warunkach środowiska przyrodniczego. Warunki panujące w gnieździe bezpośrednio oddziałują na matkę pszczelą, która zdecydowaną większość życia spędza właśnie w jego środowisku. W pośredni sposób oddziałują na nią także czynniki środowiska zewnętrznego, również te pochodzenia antropogenicznego. Czynniki te mogą przyczyniać się do obniżenia odporności pszczół. Największe problemy współczesnego pszczelarstwa to: chemizacja rolnictwa, powszechne stosowanie herbicydów, współczesne metody gospodarki pasiecznej oraz koncentracja zbyt dużej liczby rodzin na jednym pasieczysku.

Immunosupresyjnemu wpływowi patogenów na organizmy pszczół sprzyja także społeczny tryb ich życia. W rodzinie pszczelej kilkadziesiąt tysięcy osobników skupia się w gnieździe o stosunkowo małej kubaturze. Tak duże zagęszczenie osobników oraz wysoka wilgotność i temperatura sprawiają, że zarówno owady dorosłe, jak i ich formy rozwojowe są narażone na działalność patogenów. W takich warunkach tylko wysoka sprawność mechanizmów odporności decyduje o przeżyciu pszczół.

Dotychczas badania nad odpornością pszczół dotyczyły głównie robotnic i zachowania całej rodziny, natomiast niewiele uwagi poświęcano zagadnieniu odporności matek. Znaczenie badań nad odpornością matek podkreśla fakt, że matka jest jedyną reprodukcyjną samicą w rodzinie pszczelej, której jakość genetyczna i biologiczna w znacznej mierze przekłada się na stan rodziny, a co za tym idzie jej kondycję i wydajność. Największa luka w kwestii odporności matek pszczelich dotyczy wiedzy o kluczowych dla odporności systemach: proteolitycznym i antyoksydacyjnym, a także zmianie ich aktywności zależnie od wieku, statusu reprodukcyjnego oraz warunków przetrzymywania matek od momentu wygryzienia do czasu ich zagospodarowania w pasiece. Zdaniem autorki na odporność matek, która przekłada się na ich jakość, może wpływać także masowy sztuczny wychów matek oraz postępowanie z nimi w pierwszych dniach ich życia, w tym przetrzymywanie i dystrybucja w klateczkach wysyłkowych. Niewykluczone, że jednym z czynników

powodujących osłabienie kondycji rodzin pszczelich jest także spadek jakości matek produkowanych w warunkach masowego komercyjnego wychowu.

Zdaniem autorki poznanie wspomnianych wcześniej zagadnień wymaga **nowatorskiego** połączenia badań morfologicznych i biochemicznych funkcjonalnie powiązanych ze sobą kluczowych tkanek. Do tkanek tych należą: ciało tłuszczowe, hemolimfa, gruczoły kieszonkowe oraz kutikula. Natomiast odpowiedź na pytanie, jak przetrzymywanie matek pszczelich wpływa na ich odporność jest niewątpliwie **aspektem praktycznym** tej pracy i może stworzyć podstawę do uściślenia zaleceń postępowania z matkami w pierwszych dniach ich życia. Wydaje się bowiem, że dalece odbiegające od naturalnych warunków, przetrzymywanie matek w klateczkach przeznaczonych do transportu na duże odległości, może znacząco negatywnie wpływać na wartość biologiczną matek pszczelich oraz żywotność i wydajność tworzonych przez nie rodzin.

2. HIPOTEZY BADAWCZE

1. **Obraz morfologiczny** ciała tłuszczowego oraz gruczołów kieszonkowych matek zmienia się wraz z wiekiem i statusem reprodukcyjnym. Co w przypadku wieku wynika ze starzenia się organizmu, a w przypadku statusu reprodukcyjnego z obciążenia metabolicznego związanego z przygotowaniem do lotów godowych i samymi lotami oraz składaniem jaj przez matkę pszczelą. Na obraz morfologiczny tych tkanek będzie także wpływał sposób przetrzymywania matek. Prawdopodobnie tkanki matek przetrzymywanych w klateczkach, czyli w środowisku sztucznym będą bardziej zdegradowane niż tkanki matek przetrzymywanych w rodzinach, czyli w warunkach naturalnych.
2. **Aktywność metaboliczna komórek** enocytów w ciele tłuszczowym i komórek gruczołów kieszonkowych wzrasta wraz z wiekiem, ponadto jest ona wyższa u matek unasienionych czerwiących w porównaniu do nieunasienionych. Wyższą aktywnością będą cechowały się także komórki wspomnianych tkanek u matek przetrzymywanych w rodzinach, w porównaniu do matek przetrzymywanych w klateczkach.
3. Stężenia i poziomy aktywności związków **systemu proteolitycznego** w ciele tłuszczowym, gruczołach kieszonkowych, hemolimfie i na kutikuli wzrastają

wraz z wiekiem i są wyższe u matek unasienionych czerwiałych w porównaniu do nieunasienionych, co wiąże się ze statusem reprodukcyjnym. Praktykowane powszechnie w komercyjnym wychowie i dystrybucji przetrzymywanie matek pszczelich w warunkach sztucznych/klateczkach w porównaniu do przetrzymywania matek w warunkach naturalnych/rodzinkach stanowi czynnik stresogenny, który obniża poziom aktywności związków systemu proteolitycznego stanowiących biochemiczne bariery obronne organizmu.

4. Stężenia i aktywności związków **systemu antyoksydacyjnego** w ciele tłuszczowym, gruczołach kieszonkowych i hemolimfie wzrastają wraz z wiekiem i są wyższe u matek unasienionych czerwiałych w porównaniu z nieunasienionymi, co wiąże się ze statusem reprodukcyjnym. Zmiany te wynikają z biochemicznych reakcji, które przeciwdziałają nagromadzeniu reaktywnych form tlenu i toksycznych metabolitów. Aktywność tego systemu jest wyższa u matek przetrzymywanych w warunkach naturalnych/rodzinkach niż w sztucznych/klateczkach.

3. CEL PRACY

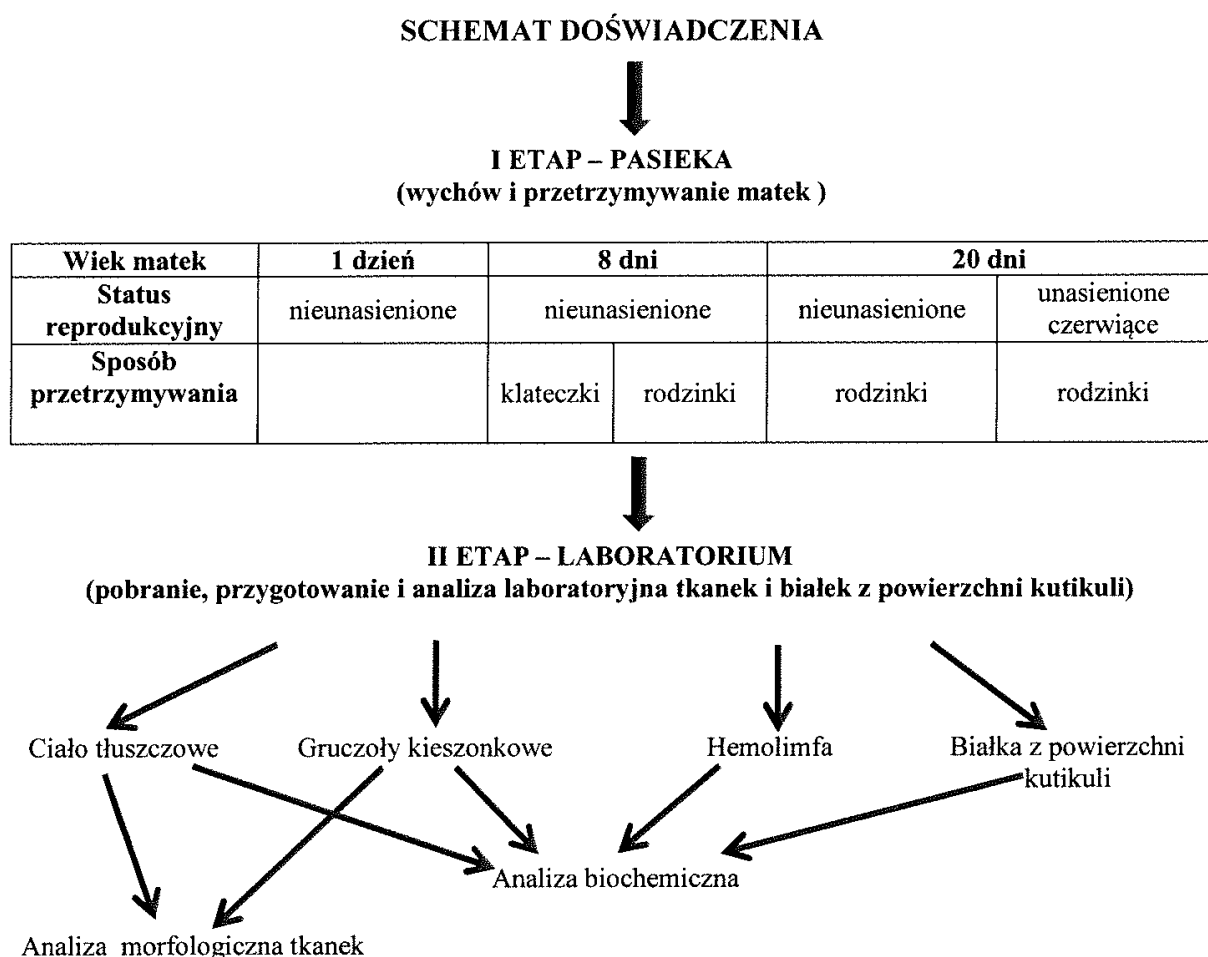
Celem pracy było określenie wpływu wieku matek pszczoły miodnej (matki 1-dniowe, 8-dniowe i 20-dniowe), ich statusu reprodukcyjnego (matki nieunasienione/ unasienione czerwiałe) oraz warunków przetrzymywania (klateczki/ rodzinki) na:

- ✓ obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego i gruczołów kieszonkowych oraz aktywność metaboliczną enocytów ciała tłuszczowego i komórek gruczołów kieszonkowych,
- ✓ poziom biochemicznych barier obronnych matki pszczeliej, takich jak: system proteolityczny oraz antyoksydacyjny ciała tłuszczowego, gruczołów kieszonkowych i hemolimfy,
- ✓ aktywność systemu proteolitycznego na kutikuli.

4. METODYKA

Doświadczenie złożone z części pasiecznej i laboratoryjnej (Ryc. 1) było prowadzone w sezonach pszczelarskich 2013-2016. Część pasieczną wykonywano w pasiece Katedry Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Uniwersytetu

Przyrodniczego w Lublinie. Część laboratoryjną realizowano w Laboratorium Biologii Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego i Pracowni Mikroskopowej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.



Ryc. 1. Schemat doświadczenia

4.1 Część pasieczna

W części pasiecznej pozyskano matki pszczele podgatunku *Apis mellifera carnica* w liczbie 981 sztuk. Utworzono następujące grupy doświadczalne matek:

- w wieku jednego dnia, zaraz po wygryzieniu, nieunasienione,
- w wieku ośmiu dni przetrzymywane w klateczkach wysyłkowych, nieunasienione,
- w wieku ośmiu dni przetrzymywane w rodzinkach, nieunasienione,
- w wieku dwudziestu dni przetrzymywane w rodzinkach, nieunasienione,
- w wieku dwudziestu dni przetrzymywane w rodzinkach, unasienione czerwιάce.

Z puli wszystkich matek, jeszcze w dniu wygryzania 287 sztuk przewieziono do laboratorium, gdzie tego samego dnia poddawano je zabiegom opisanym w rozdziale: „Część laboratoryjna”. Grupę tę określono jako matki **1-dniowe nieunasienione (1D/NU)**. Inne matki przetrzymywano w klateczkach wraz z dziesięcioma pszczołami towarzyszącymi, w ciemnym pomieszczeniu o stałej temperaturze 25°C przez 8 dni. Matki te określono jako **8-dniowe nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach (8D/NU/KL)** i uzyskano ich 224. Matki te w laboratorium poddawano zabiegom opisanym w rozdziale: „Część laboratoryjna”. Matki w rodzinach przetrzymywano przez 8 lub 20 dni. Wszystkim matkom 8-dniowym uniemożliwiano loty godowe przez zablokowanie wylotu kratą odgradową. Matki te określono jako **8-dniowe nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach (8D/NU/RO)**. Takich matek pozyskano 205 sztuk. Części rodzin z matkami 20-dniowymi wyloty blokowano kratą odgradową, matki z tych rodzin określono jako **20-dniowe nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach (20D/NU/RO)**. Takich matek pozyskano 91 sztuk. Innym rodzinom wylotów nie blokowano, umożliwiając matkom loty godowe. Z puli tych matek, w badaniach wykorzystywano tylko te, które do 20 dnia, licząc do dnia wygryzienia rozpoczęły czerwienie, pozostałe eliminowano. Matki te określono jako **20-dniowe unasienione, przetrzymywane w rodzinach, czerwiące (20D/UN/RO/CZ)**, pozyskano ich 174. Wszystkie matki przetrzymywane w rodzinach, odpowiednio 8 lub 20 dnia licząc od dnia wygryzienia, wyjmowano z rodzin i umieszczano w klateczkach ze świeżym ciastem miodowo-cukrowym i pszczołami z rodziny wychowującej, po czym przewożono je do laboratorium i jeszcze tego samego dnia poddawano zabiegom opisanym w rozdziale: „Część laboratoryjna”.

4.2 Część laboratoryjna

Celem określenia wpływu wieku na wskaźniki morfologiczne i biochemiczne wybranych tkanek oraz na stężenie białka ogólnego i aktywność enzymów na powierzchni kutikuli, porównywano **trzy grupy wiekowe matek**. Pierwszą stanowiły matki **1-dniowe nieunasienione (1D/NU)**, a dwie pozostałe były to grupy matek przetrzymywanych w warunkach naturalnych, czyli w rodzinach (RO): **8-dniowe nieunasienione przetrzymywane w rodzinach (8D/NU/RO)** i **20-dniowe nieunasienione przetrzymywane w rodzinach (20D/NU/RO)**.

Celem określenia wpływu statusu reprodukcyjnego na wskaźniki morfologiczne i biochemiczne wybranych tkanek oraz na stężenie białka ogólnego i aktywność enzymów na powierzchni kutikuli porównywano matki: **20-dniowe nieunasienione przetrzymywane w rodzinkach (20D/NU/RO) i 20-dniowe unasienione przetrzymywane w rodzinkach, czerwiące (20D/UN/RO/CZ).**

Celem określenia wpływu sposobu przetrzymywania na wskaźniki morfologiczne i biochemiczne wybranych tkanek oraz na stężenie białka ogólnego i aktywność enzymów na powierzchni kutikuli porównywano matki **8-dniowe nieunasienione przetrzymywane w klateczkach (8D/NU/KL) z matkami 8-dniowymi nieunasienionymi przetrzymywanymi w rodzinkach (8D/NU/RO).**

Liczbę matek wykorzystanych w poszczególnych analizach wykonanych w obrębie oceny wymienionych wyżej cech zamieszczono w Tabeli 1.

Tabela 1. Liczebność poszczególnych grup matek pszczelich wykorzystanych w badaniach nad wpływem wieku, statusu reprodukcyjnego i sposobu ich przetrzymywania na wskaźniki morfologiczne i biochemiczne wybranych tkanek i białek z powierzchni kutikuli.

Czynniki grupujące matki pszczele			Liczba matek wykorzystanych w analizach biochemicznych tkanek			Liczba matek wykorzystanych w analizach morfologicznych tkanek
Wiek	Sposób przetrzymywania	Status reprodukcyjny	CT+G	Hemolimfa	Białka z powierzchni kutikuli	CT+G
1-dniowe		NU	50	155	61	21
Suma			287			
8-dniowe	KL	NU	50	115	44	15
Suma			224			
8-dniowe	RO	NU	50	120	30	5
Suma			205			
20-dniowe	RO	NU	25	50	11	5
Suma			91			
20-dniowe	RO	UN/CZ	75	70	20	9
Suma			174			
Suma matek: sezony pszczelarskie 2013-2016			981			

CT+G – ciało tłuszczowe i gruczoły kieszonkowe

KL – matki przetrzymywane w klateczkach

RO – matki przetrzymywane w rodzinkach

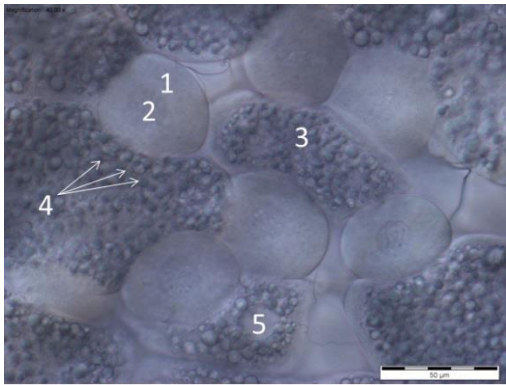
NU – matki nieunasienione

UN/CZ – matki unasienione czerwiące

Taki układ pozwolił na zbadanie wpływu wieku, statusu reprodukcyjnego i sposobu przetrzymywania matek na:

- obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego i gruczołów kieszonkowych oraz ich aktywność metaboliczną (mikroskop stereoskopowy (Olympus SZ60), mikroskop optyczny (Olympus BX61), aparat fotograficzny (Olympus DP72)),
- wskaźniki biochemiczne systemu proteolitycznego: ciała tłuszczowego, gruczołów kieszonkowych, hemolimfy i białek z powierzchni kutikuli:
 - ✓ stężenie białka ogólnego (metoda Lowry'ego),
 - ✓ aktywność proteolityczna wobec różnych substratów; najbardziej optymalnym substratem do oznaczania aktywności: proteaz i inhibitorów proteaz okazała się hemoglobina (metoda Ansona),
 - ✓ aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych (metoda Ansona),
 - ✓ aktywność proteolityczna wobec inhibitorów diagnostycznych enzymów proteolitycznych (metoda Lee i Lina),
 - ✓ aktywność naturalnych inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych (metoda Lee i Lina),
- wskaźniki biochemiczne systemu antyoksydacyjnego: ciała tłuszczowego, gruczołów kieszonkowych i hemolimfy, takie jak:
 - ✓ aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (komercyjny zestaw (Sigma-Aldrich)),
 - ✓ aktywność katalazy (CAT) (komercyjny zestaw (EnzyChromTM)),
 - ✓ poziom całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (TAC) (komercyjny zestaw OxiSelectTM)).

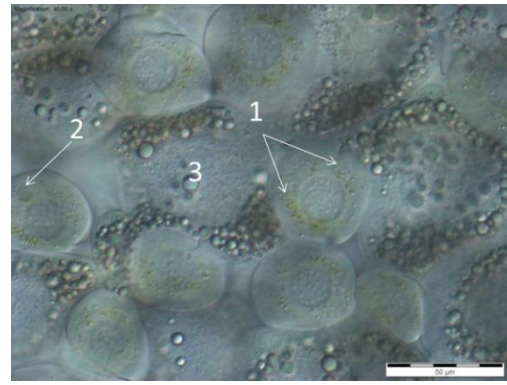
W obrazie morfologicznym komórek ciała tłuszczowego i gruczołów kieszonkowych oceniano: wygląd enocytów, wygląd trofocytów, obecność kropeł tłuszczu, pojawienie się nowych struktur komórkowych, zmianę barwy struktur komórkowych (Ryc. 2 – 6).



(pow. 40,00x)

Ryc. 2. Obraz morfologiczny ciała tłuszczowego

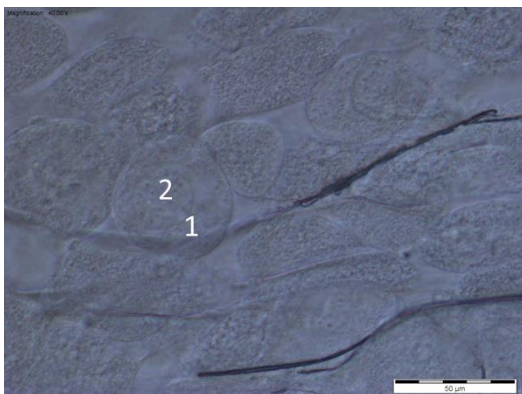
1. enocyt
2. jądro komórkowe enocytu
3. trofocyt
4. krople tłuszczu w trofocycie
5. wakuole trofocytu



(pow. 40,00x)

Ryc. 3. Obraz morfologiczny ciała tłuszczowego

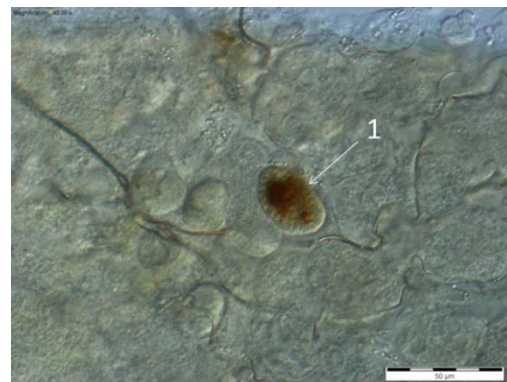
1. żółte ziarnistości układające się wokół jądra enocytu
2. wakuole enocytu
3. jądro komórkowe trofocytu



(pow. 40,00x)

Ryc. 4. Obraz morfologiczny gruczołów kieszonkowych

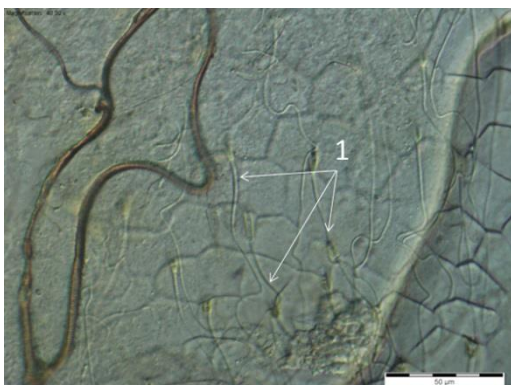
1. komórka gruczołowa
2. jądro komórkowe



(pow. 40,00x)

Ryc. 5. Obraz morfologiczny gruczołów kieszonkowych

1. ciemna grudka



(pow. 40,00x)

Ryc. 6. Przewody wyprowadzające komórek gruczołów kieszonkowych
1. przewody wyprowadzające o widocznych żółtych ujściach wychodzących na styku wielokątnych komórek

4.3 Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano w programie SAS (SAS® software, Version 9.4 of the SAS System for Windows. Copyright © 2013 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Przy ocenie wpływu wieku matek na poziom badanych cech, istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami cech w trzech grupach wiekowych matek oceniano testem Tukeya. W przypadku oceny wpływu statusu reprodukcyjnego i sposobu przetrzymywania stosowano jednoczynnikową analizę wariancji. Jako miary zmienności cech wewnątrz grup użyto odchylenia standardowego.

5. WYNIKI

5.1 Wpływ wieku

5.1.1 Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego i aktywność metaboliczna enocytów

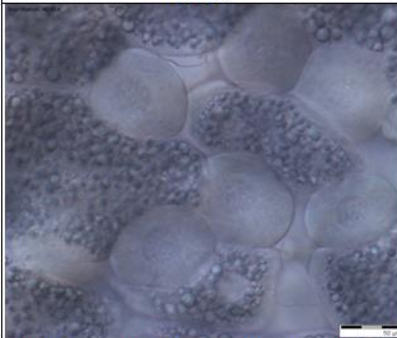
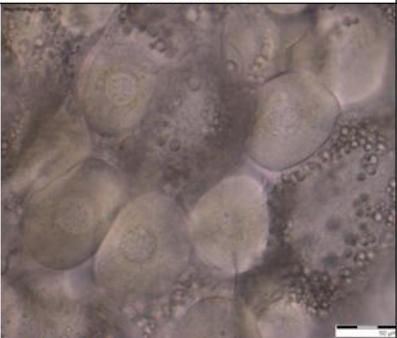
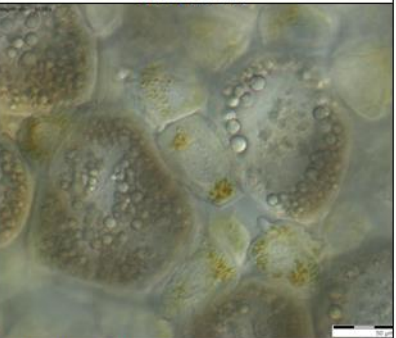
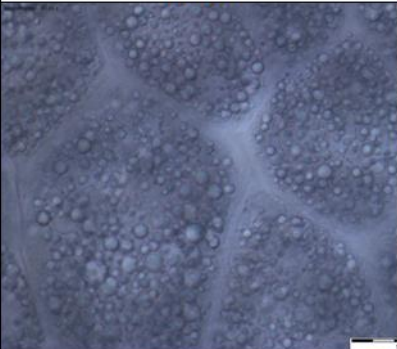
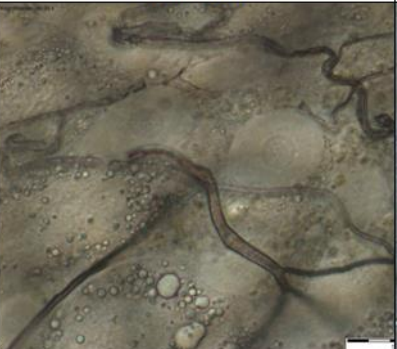
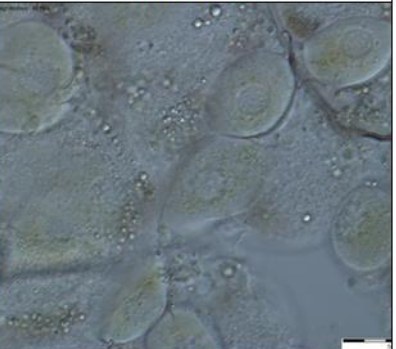
Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego

Niezależnie od lokalizacji obraz morfologiczny ciała tłuszczowego najwyraźniej zmienił się między 1 a 8 dniem życia matek (Tabela 2 A, B, C). Zmiany te dotyczyły zarówno trofocytów (komórki tłuszczowe), jak też enocytów. W trofocytach znacznie zmniejszyła się ilość i średnica kropeł tłuszczu, ponadto zmieniło się ich rozłożenie. U matek w 1 dniu życia krople tłuszczu rozmieszczone były na całej powierzchni trofocytów, przez co niewidoczne były ich jądra i wakuole. Natomiast w 8 dniu życia krople tłuszczu rozmieszczone były na brzegach trofocytów, a w enocytach pojawiły się jasnożółte ziarnistości. Zmiany między 8 a 20 dniem życia matek nie były już tak wyraźne i dotyczyły głównie enocytów, w których wspomniane wcześniej ziarnistości zmieniły barwę z jasnożółtej na ciemnożółtą.

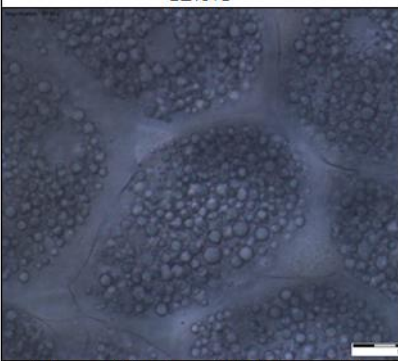
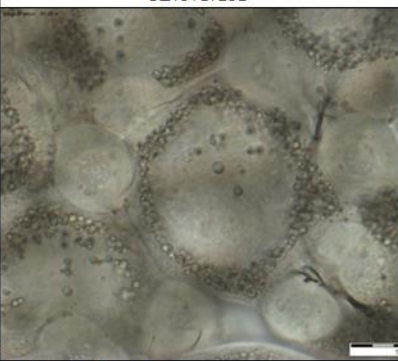
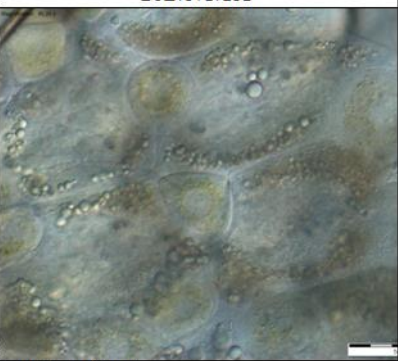
U matek w 1 dniu życia obraz morfologiczny ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy sternitach wyraźnie różnił się od obrazu ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy tergitech (Tabela 2 A, B). Między trofocytami w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach wyraźnie widoczne były enocyty, podczas gdy w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergitech, trofocyty były tak duże i ściśle upakowane, że enocyty były trudno zauważalne. Między matkami w 8 i 20 dniu życia takich różnic nie było, przy czym ilość i wielkość kropeł tłuszczu

w trofocytach ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy sternitach była większa niż przy tergitech (Tabela 2 A, B, C).

Tabela 2. Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego zależnie od miejsca jego lokalizacji: przy sternitach (A), przy tergicie III (B), przy tergicie V (C), w trzech grupach wiekowych matek (pow. 40,00x)

A) CIAŁO TŁUSZCZOWE ZLOKALIZOWANE PRZY STERNITACH		
1D/NU	8D/NU/RO	20D/NU/RO
		
- duże trofocyty, przybierające wielokątny kształt, - krople tłuszczu rozmieszczone na całej powierzchni trofocytów, niewidoczne jądra i wakuola, - enocyty okrągłe, układające się wokół trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe,	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - okrągłe enocyty, układające się wokół trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe i jasnożółte ziarnistości,	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów lub na całej ich powierzchni, - enocyty „ściśnięte”, układające się wokół trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - ciemnożółte ziarnistości w enocytach,
B) CIAŁO TŁUSZCZOWE ZLOKALIZOWANE PRZY TERCIE III		
1D/NU	8D/NU/RO	20D/NU/RO
		
- duże, przybierające wielokątny kształt trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na całej powierzchni trofocytów, niewidoczne jądra i wakuole, - trudno zauważalne enocyty z powodu bardzo dużych i ściśle upakowanych trofocytów,	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe i jasnożółte ziarnistościami,	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe i żółte ziarnistości,

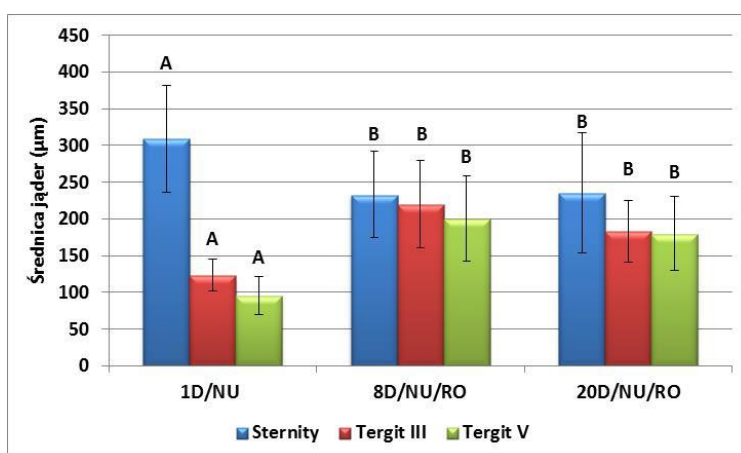
1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; 20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach

C) CIAŁO TŁUSZCZOWE ZLOKALIZOWANE PRZY TERGICIE V		
1D/NU	8D/NU/RO	20D/NU/RO
		
- duże, przybierające wielokątny kształt trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na całej powierzchni trofocytów, - wakuole w trofocytach przesunięte do brzegu komórki, - trudno zauważalne enocyty z powodu bardzo dużych i ściśle upakowanych trofocytów.	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - okrągłe enocyty, ułożone wokół trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe i jasnożółte ziarnistości.	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe i ciemnożółte ziarnistości na całej powierzchni komórek.

1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; 20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach

Aktywność metaboliczna enocytów ciała tłuszczowego

Aktywność metaboliczna enocytów ciała tłuszczowego, której miarą jest średnica jąder tych komórek, najwyraźniej zmieniała się między 1 a 8 dniem życia matek, a kierunek tych zmian zależał od lokalizacji ciała tłuszczowego (Ryc. 7). Świadczy o tym zmniejszenie średnicy jąder enocytów ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy sternitach oraz jej wzrost przy tergitech u matek w 8 dniu życia w porównaniu do tych w 1 dniu życia. Natomiast u matek w 20 dniu życia w porównaniu do matek w 8 dniu życia nie było istotnych zmian.



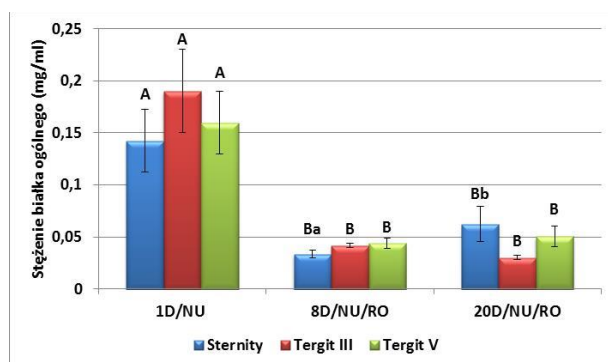
1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; 20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ między poszczególnymi lokalizacjami ciała tłuszczowego w trzech grupach wiekowych matek; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 7. Średnica jąder enocytów ciała tłuszczowego zależnie od miejsca jego lokalizacji, w trzech grupach wiekowych matek

5.1.2 Analizy biochemiczne ciała tłuszczowego

5.1.2.1 Stężenie białka ogólnego

Niezależnie od lokalizacji ciała tłuszczowego, stężenie białka ogólnego było znacznie wyższe w 1 dniu życia matek niż w 8 i 20 dniu (Ryc. 8). Natomiast różnica między matkami w 8 a 20 dniu życia ograniczała się jedynie do wyższego stężenia białka ogólnego w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach u matek 20-dniowych.



1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; 20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ między poszczególnymi lokalizacjami ciała tłuszczowego w trzech grupach wiekowych matek; a, b – różnice istotne przy $p \leq 0,05$ między poszczególnymi lokalizacjami ciała tłuszczowego w trzech grupach wiekowych matek; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 8. Stężenie białka ogólnego w ciele tłuszczowym zależnie od miejsca jego lokalizacji, w trzech grupach wiekowych matek

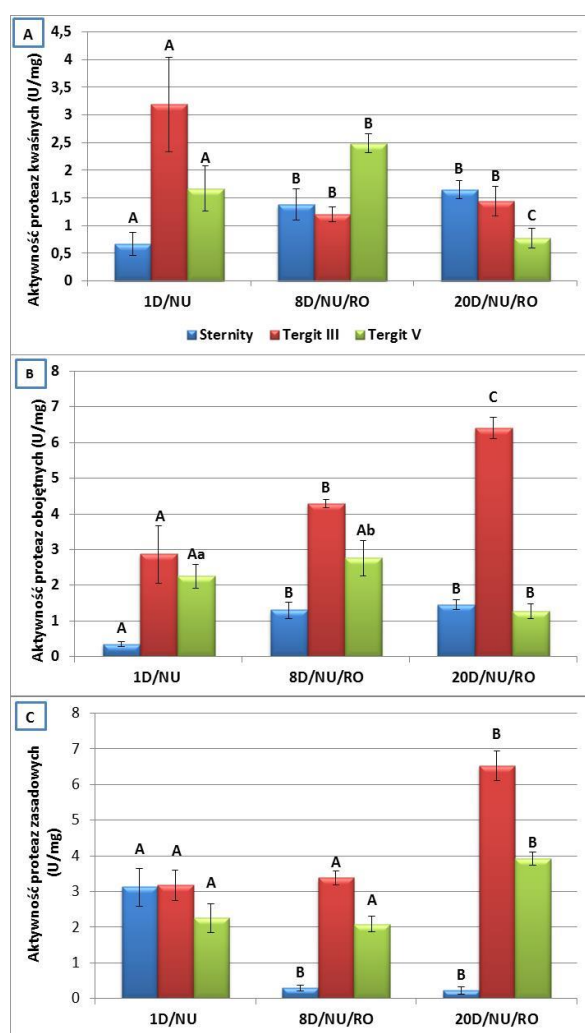
5.1.2.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Aktywności proteaz w ciele tłuszczowym matek zależały od ich wieku oraz od lokalizacji tej tkanki (Ryc. 9). Aktywność proteaz kwaśnych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach wzrosła w 8 i 20 dniu życia matek w porównaniu do matek 1-dniowych, podczas gdy w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie III zmalała (Ryc. 9A). Jeszcze inaczej zmiany te zachodziły w ciele tłuszczowym przy tergicie V. W 1 dniu życia matek aktywność proteaz kwaśnych była niższa niż w 8 dniu, za to wyższa niż w 20 dniu życia.

U matek w 8 i 20 dniu życia aktywność proteaz obojętnych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach nie różniła się istotnie, a przy tym była wyższa niż u matek w 1 dniu życia (Ryc. 9B). Natomiast przy tergicie III, aktywność tych enzymów wzrastała wraz z wiekiem. Aktywność proteaz obojętnych

w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie V była wyższa u matek 8-dniowych niż u 1-dniowych, a przy tym była znacznie niższa u 20-dniowych w porównaniu do dwóch pozostałych grup.

Aktywność proteaz zasadowych w 8 i 20 dniu życia matek w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach nie różniła się istotnie, a przy tym była znacznie niższa w porównaniu do matek w 1 dniu życia (Ryc. 9C). Natomiast przy tergicie III i V aktywność tych enzymów nie różniła się istotnie u matek w 1 i 8 dniu życia i była znacznie niższa w porównaniu do matek w 20 dniu życia.



1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione;
8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach;
20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach;
A, B, C – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ między poszczególnymi lokalizacjami ciała tłuszczowego w trzech grupach wiekowych matek;
a, b – różnice istotne przy $p \leq 0,05$ między poszczególnymi lokalizacjami ciała tłuszczowego w trzech grupach wiekowych matek;
wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 9. Aktywność proteaz kwaśnych (A), obojętnych (B) i zasadowych (C) w ciele tłuszczowym zależnie od miejsca jego lokalizacji, w trzech grupach wiekowych matek

5.1.2.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Nie wykazano aktywności inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych w ciele tłuszczowym u matek w wieku 1 i 8 dni, te aktywności wykazano jedynie u matek w 20 dniu życia. U tych matek w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie III wysoka była aktywność inhibitorów proteaz

kwaśnych (8,3449 U/mg) i zasadowych (4,5507 U/mg). Natomiast aktywność proteaz inhibitorów obojętnych była wysoka w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach (2,6072 U/mg) i tergicie V (2,8747 U/mg).

5.1.2.4 Aktywność SOD

Aktywność SOD w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach nie zmieniała się wraz z wiekiem matek. Natomiast w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie III była wyższa u matek w 20 dniu życia (0,46242 U/ml) niż w 8 dniu (0,41791 U/ml), a przy tergicie V zarówno u matek 8-dn. (0,46899 U/ml) jak i 20-dn. (0,47486 U/ml) była wyższa w porównaniu z 1-dniowymi (0,44394 U/ml).

5.1.2.5 Aktywność CAT

Aktywność CAT zależała od miejsca lokalizacji ciała tłuszczowego w trzech grupach wiekowych matek. Aktywność CAT w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach i tergicie V wzrosła u matek w 8 dniu życia (4,956 U/l; 2,9389 U/l) w porównaniu do matek 1-dniowych (1,3991 U/l; 0,98 U/l), po czym zmalała u matek w 20 dniu (2,5246 U/l; 0,954 U/l). Natomiast w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie III aktywność CAT wzrastała wraz z wiekiem (0,888 U/l; 2,5071 U/l; 4,2097 U/l).

5.1.2.6 Poziom TAC

Poziom TAC w ciele tłuszczowym niezależnie od jego lokalizacji był wyższy u matek w 1 dniu życia (S-1,3399 mmol/l; TIII-10,897 mmol/l; TV-1,9436 mmol/l) niż w 8 dniu (S-0,74089 mmol/l; TIII-0,7024 mmol/l; TV-0,78419 mmol/l) i 20 dniu (S-0,79862 mmol/l; TIII-0,44256 mmol/l; TV-0,6134 mmol/l). Poziom ten nie różnił się w ciele tłuszczowym pomiędzy matkami w 8 i 20 dniu życia. Bardzo wysoki poziom TAC odnotowano u matek 1-dniowych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie III.

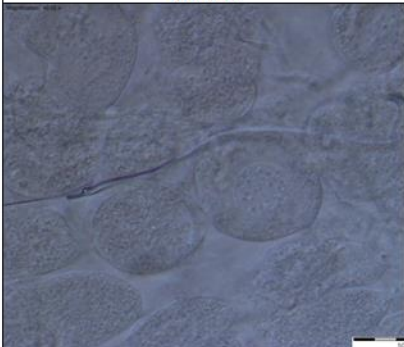
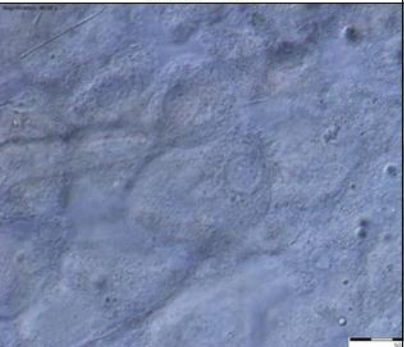
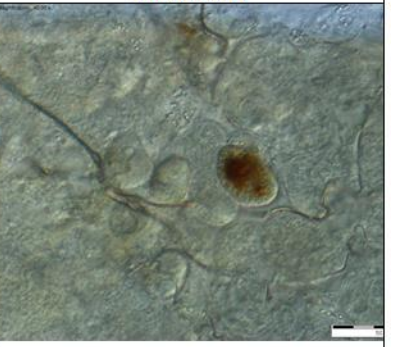
5.1.3 Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych i ich aktywność metaboliczna

Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych

U matek 1-, 8- i 20-dniowych widoczne były okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym. U matek w wieku 20 dni dodatkowo

pojawiły się ciemne grudki, które nie występowały w dwóch pozostałych grupach matek (Tabela 3).

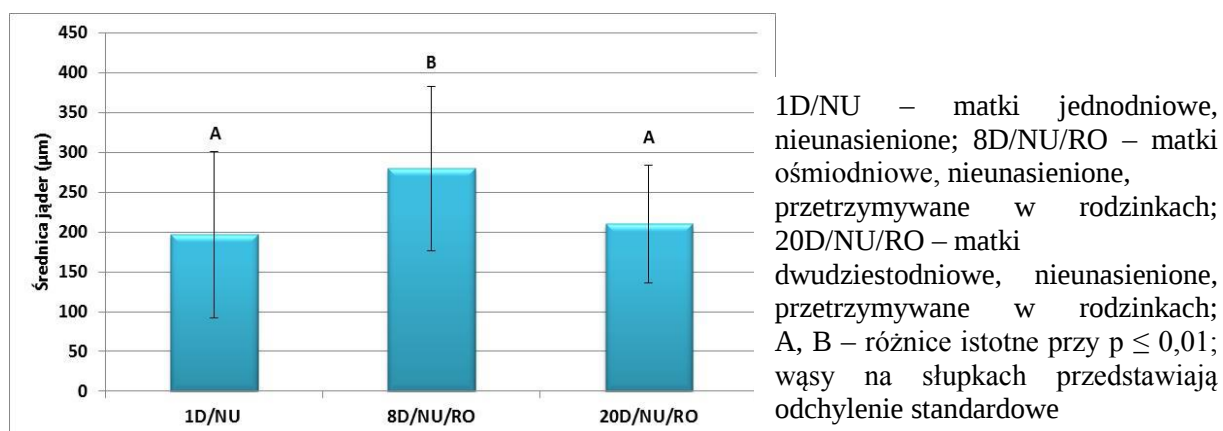
Tabela 3. Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych w trzech grupach wiekowych matek (pow. 40,00x)

KOMÓRKI GRUCZOŁÓW KIESZONKOWYCH		
1D/NU	8D/NU/RO	20D/NU/RO
		
- okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym.	- okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym.	- okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym, - duże ciemne grudki.

1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzyńkach; 20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzyńkach

Aktywność metaboliczna komórek gruczołów kieszonkowych

Aktywność metaboliczna komórek gruczołów kieszonkowych wyrażona średnicą jąder tych komórek, była zbliżona u matek w wieku 1 i 20 dni, a przy tym niższa niż u matek w 8 dniu życia (Ryc. 10).



Ryc. 10. Średnica jąder komórek gruczołów kieszonkowych, w trzech grupach wiekowych matek

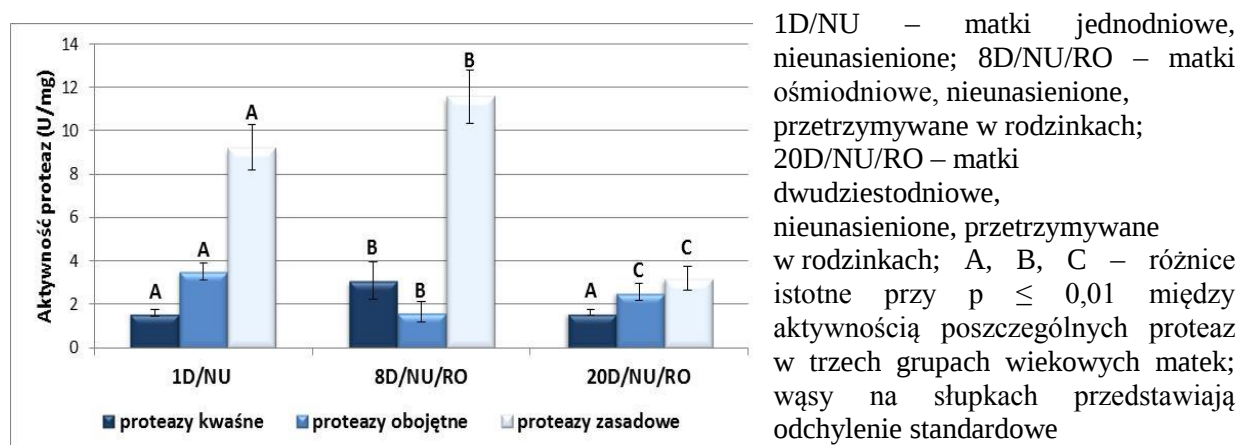
5.1.4 Analizy biochemiczne gruczołów kieszonkowych

5.1.4.1 Stężenie białka ogólnego

Stężenie białka ogólnego w gruczołach kieszonkowych było najwyższe u matek w 20 dniu życia (0,0407 mg/ml), a najniższe u matek w 8 dniu (0,01893 mg/ml), natomiast u matek w wieku 1 dnia (0,03242 mg/ml) było pośrednie względem matek z dwóch pozostałych grup wiekowych.

5.1.4.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Tendencje zmian aktywności proteaz kwaśnych i zasadowych w gruczołach kieszonkowych były podobne (Ryc. 11). W 8 dniu życia matek aktywność tych proteaz była wyższa w porównaniu do matek w 1 i 20 dniu życia. Szczególnie widoczne było obniżenie aktywności proteaz zasadowych u matek w 20 dniu życia w porównaniu do matek w wieku 1 i 8 dni. W przypadku proteaz obojętnych tendencja była odwrotna.



Ryc. 11. Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych w gruczołach kieszonkowych w trzech grupach wiekowych matek

5.1.4.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Nie wykazano aktywności inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych w gruczołach kieszonkowych u matek w wieku 1 i 8 dni. Natomiast u matek w wieku 20 dni zaobserwowano szczególnie wysoką aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych (7,7436 U/mg), z kolei inhibitory proteaz obojętnych (1,6986 U/mg) i zasadowych (1,5772 U/mg) wykazały podobną aktywność.

5.1.4.4 Aktywność antyoksydantów enzymatycznych

Wraz z wiekiem matek w gruczołach kieszonkowych wzrastały: aktywność SOD (0,22982 U/ml; 0,34802 U/ml; 0,42662 U/ml) oraz CAT (0,822 U/l; 8,4434 U/l; 10,362 U/l).

5.1.4.5 Poziom TAC

Poziom TAC w gruczołach kieszonkowych nie różnił się istotnie pomiędzy matkami w 8 dniu życia (0,83555 mmol/l) i 20 dniu życia (0,83336 mmol/l), a przy tym był wyższy w porównaniu z matkami 1-dniowymi (0,60007 mmol/l).

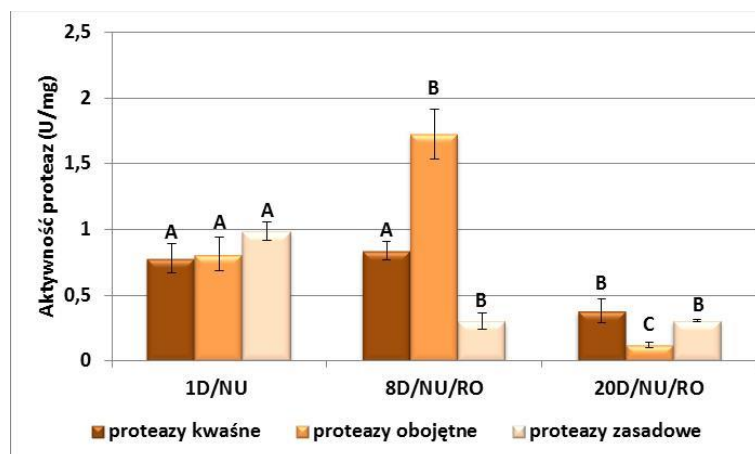
5.1.5 Analizy biochemiczne hemolimfy

5.1.5.1 Stężenie białka ogólnego

Stężenie białka ogólnego w hemolimfie matek w wieku 8 dni (0,28725 mg/ml) i 20 dni (0,29692 mg/ml) nie różniło się istotnie, a przy tym było wyższe niż u matek w 1 dniu życia (0,22528 mg/ml).

5.1.5.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Aktywność proteaz kwaśnych była podobna u matek w 1 i 8 dniu życia, a przy tym była wyższa niż u matek w wieku 20 dni (Ryc. 12). Natomiast aktywność proteaz obojętnych wzrosła znacznie u matek w wieku 8 dni w porównaniu do tych w 1 dniu życia, po czym spadła w wieku 20 dni do aktywności istotnie niższej niż u obu wspomnianych wcześniej grup wiekowych matek. Aktywność proteaz zasadowych była podobna u matek w 8 i 20 dniu życia, a przy tym była znacznie niższa niż u matek w 1 dniu życia (Ryc. 12).



1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; 20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; A, B, C – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ między aktywnością poszczególnych proteaz w trzech grupach wiekowych matek; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 12. Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych w hemolimfie w trzech grupach wiekowych matek

5.1.5.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych stwierdzono jedynie u matek w wieku 20 dni. W 1 dniu życia matek aktywne były tylko inhibitory proteaz zasadowych, natomiast w 8 dniu wykazano inhibitory proteaz kwaśnych i zasadowych. Aktywność inhibitorów proteaz zasadowych była podobna u matek w 1 dniu życia (5,2445 U/mg) i 8 dniu życia (5,344 U/mg), po czym w wieku 20 dni (1,4558 U/mg) znacząco spadła. Natomiast aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych u matek w 20 dniu życia (3,8169 U/mg) była wyższa niż u tych w 8 dniu (2,5382 U/mg).

5.1.5.4 Aktywność antyoksydantów enzymatycznych

W hemolimfie aktywność SOD znacznie wzrosła u matek w 8 dniu życia (10,642 U/ml) w porównaniu z matkami 1-dniowymi (0,43978 U/ml), po czym znacznie obniżyła się u matek w 20 dniu życia (0,46663 U/ml). Natomiast aktywność CAT w hemolimfie wzrastała wraz z wiekiem matek (7,2911 U/l; 10,509 U/l; 11,553 U/l).

5.1.5.5 Poziom TAC

Poziom TAC w hemolimfie matek w 8 dniu życia (6,5071 mmol/l) wzrósł w porównaniu z matkami 1-dniowymi (3,6131 mmol/l), po czym obniżył się u matek w 20 dniu życia (3,1572 mmol/l).

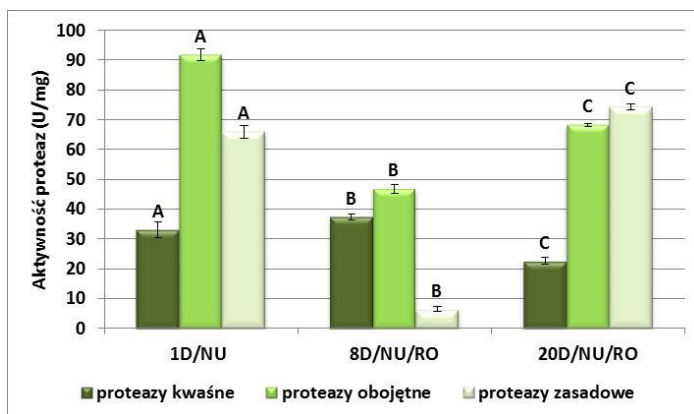
5.1.6 Analizy biochemiczne roztworów białek z powierzchni kutikuli

5.1.6.1 Stężenie białka ogólnego

Stężenie białka ogólnego na powierzchni kutikuli matek w wieku 8 dni (0,039 mg/ml) i 20 dni (0,0421 mg/ml) było zbliżone, a przy tym wyższe niż u matek w 1 dniu życia (0,0244 mg/ml).

5.1.6.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Tendencje zmian w przypadku aktywności proteaz obojętnych i zasadowych na powierzchni kutikuli były podobne (Ryc. 13). Bardzo wysoką ich aktywność stwierdzono u matek w 1 dniu życia, po czym znacznie spadła w 8 dniu życia matek, a następnie znacząco wzrosła w 20 dniu życia matek. Szczególnie widoczne było to w przypadku proteaz zasadowych. Odwrotna tendencja wystąpiła przy aktywności proteaz kwaśnych.



1D/NU – matki jednodniowe, nieunasienione; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; 20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; A, B, C – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ między aktywnością poszczególnych proteaz w trzech grupach wiekowych matek; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 13. Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych na powierzchni kutikuli w trzech grupach wiekowych matek

5.1.6.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Na powierzchni kutikuli u matek w wieku 8 dni, inhibitory proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych nie były aktywne. Matki 1-dniowe nie wykazały aktywności inhibitorów proteaz zasadowych, a 20-dniowe obojętnych. Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych była wyższa u matek w 20 dniu życia (26,4047 U/mg) niż w 1 dniu (21,953 U/mg).

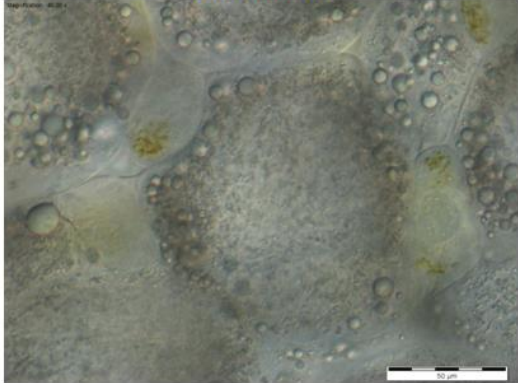
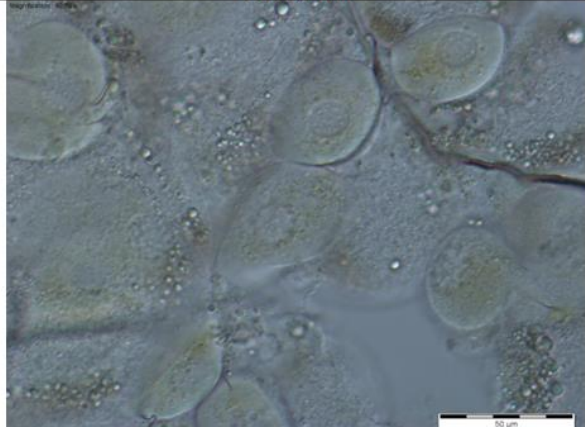
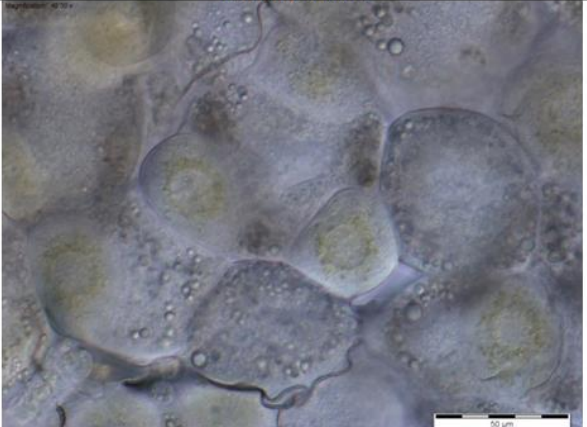
5.2 Wpływ statusu reprodukcyjnego

5.2.1 Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego i aktywność metaboliczna enocytów

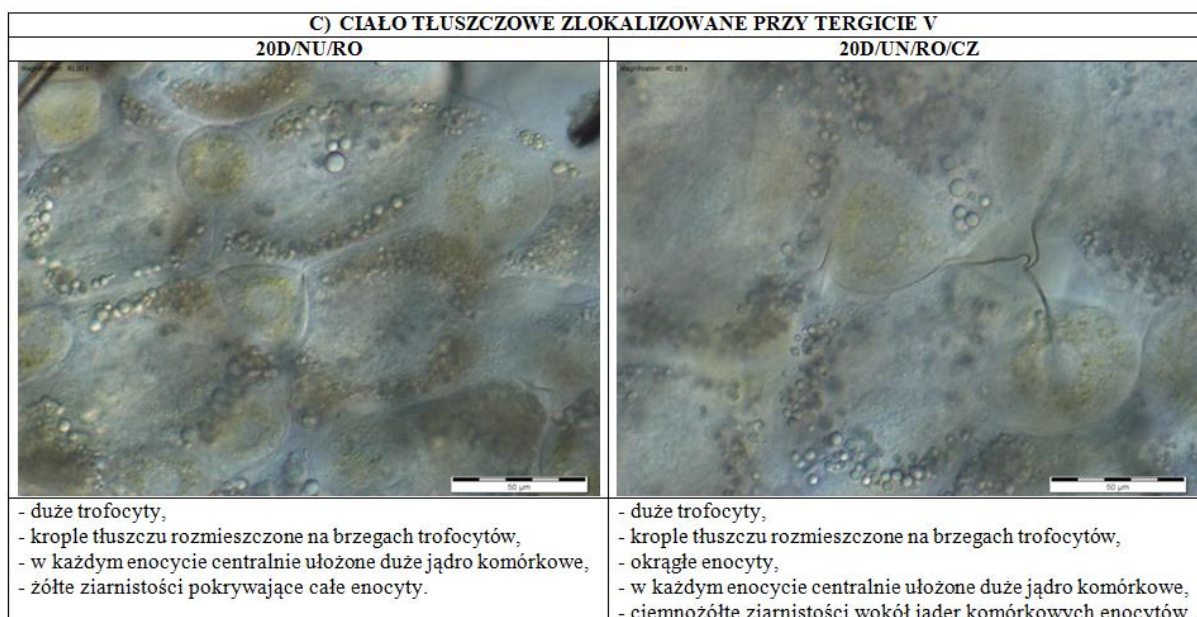
Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego

Wraz ze zmianą statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiące najbardziej zmienił się obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy sternitach (Tabela 4 A). U matek unasienionych czerwiących w porównaniu do nieunasienionych zwiększyła się wielkość trofocytów, przez co kształt enocytów zmienił się ze zbliżonego do owalnego na nieregularny/wielokątny. Nie zaobserwowano wyraźnych zmian w wielkości i rozłożeniu kropeł tłuszczu w trofocytach. Niezależnie od statusu reprodukcyjnego oraz miejsca lokalizacji ciała tłuszczowego widoczne były żółte ziarnistości w enocytach, przy czym u matek unasienionych czerwiących w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergitech ziarnistości te miały ciemnożółtą barwę i tworzyły charakterystyczne „pierścienie” wokół jąder komórkowych enocytów (Tabela 4 B, C).

Tabela 4. Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego zależnie od miejsca lokalizacji: przy sternitach (A), przy tergicie III (B), przy tergicie V (C) oraz zależnie od statusu reprodukcyjnego (pow. 40,00x)

A) CIAŁO TŁUSZCZOWE ZLOKALIZOWANE PRZY STERNITACH	
20D/NU/RO	20D/UN/RO/CZ
	
- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów lub na całej ich powierzchni, - „ściśnięte” enocyty, układające się wokół trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - ciemnożółte ziarnistości w enocytach,	- bardzo duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów lub na całej ich powierzchni, - duże i ciasno upakowane trofocyty, - „ściśnięte” enocyty - przybierające nieregularne kształty, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - ciemnożółte ziarnistości w enocytach,
B) CIAŁO TŁUSZCZOWE ZLOKALIZOWANE PRZY TERCIE III	
20D/NU/RO	20D/UN/RO/CZ
	
- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - żółte ziarnistości w enocytach,	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - okrągłe enocyty, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - ciemnożółte ziarnistości tworzące „pierścienie” wokół jąder komórkowych enocytów,

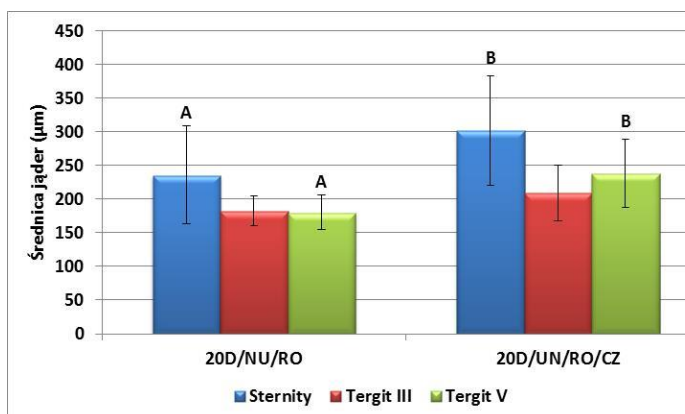
20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach;
20D/UN/RO/CZ – matki dwudziestodniowe, unasienione, przetrzymywane w rodzinach, czerwące



20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach;
 20D/UN/RO/CZ – matki dwudziestodniowe, unasienione, przetrzymywane w rodzinkach, czerwące

Aktywność metaboliczna enocytów ciała tłuszczowego

Zmiana statusu reprodukcyjnego z matek nieunasienionych na unasienione czerwące spowodowała zwiększenie średnicy jąder enocytów ciała tłuszczowego, co wskazuje na wzrost aktywności metabolicznej tych komórek przy sternitach i przy tergicie V, natomiast nie zmieniła się ona przy tergicie III (Ryc. 14).



20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; 20D/UN/RO/CZ – matki dwudziestodniowe, unasienione, przetrzymywane w rodzinkach, czerwące; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ między poszczególnymi lokalizacjami ciała tłuszczowego zależnie od statusu reprodukcyjnego; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 14. Średnica jąder enocytów ciała tłuszczowego zależnie od miejsca jego lokalizacji i statusu reprodukcyjnego matek

5.2.2 Analizy biochemiczne ciała tłuszczowego

5.2.2.1 Stężenie białka ogólnego

Niezależnie od lokalizacji ciała tłuszczowego, zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych (S-0,06245 mg/ml; TIII-0,03026 mg/ml; TV-0,05032

mg/ml) na unasienione czerwιάce (S-0,10814 mg/ml; TIII-0,07992 mg/ml; TV-0,10915 mg/ml) spowodowała znaczny wzrost stężenia białka ogólnego w tej tkance.

5.2.2.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego z matek nieunasienionych na unasienione czerwιάce spowodowała wzrost aktywności proteaz kwaśnych i obojętnych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach i tergicie V oraz proteaz zasadowych przy sternitach. Ponadto zmiana tego statusu spowodowała obniżenie aktywności proteaz obojętnych w ciele tłuszczowym przy tergicie III oraz proteaz zasadowych przy tergicach III i V.

5.2.2.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwιάce spowodowała wzrost aktywności inhibitorów proteaz kwaśnych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie III, nie wpływając na ich aktywność przy sternitach i przy tergicie V. Natomiast aktywność inhibitorów proteaz obojętnych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach i przy tergicie III wzrosła, a przy tergicie V nie zmieniła się. W ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach wzrosła aktywność inhibitorów proteaz zasadowych, przy tergicie III zmalała, a przy tergicie V nie zmieniła się.

5.2.2.4 Aktywność antyoksydantów enzymatycznych

Zmiana statusu reprodukcyjnego z matek nieunasienionych na unasienione czerwιάce spowodowała wzrost aktywności CAT w ciele tłuszczowym niezależnie od jego lokalizacji oraz wzrost aktywności SOD w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach i tergicie V, a przy tergicie III nie wykazano istotnej zmiany.

5.2.2.5 Poziom TAC

Zmiana statusu reprodukcyjnego z matek nieunasienionych na unasienione czerwιάce spowodowała wzrost TAC w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicach, natomiast obniżenie przy sternitach.

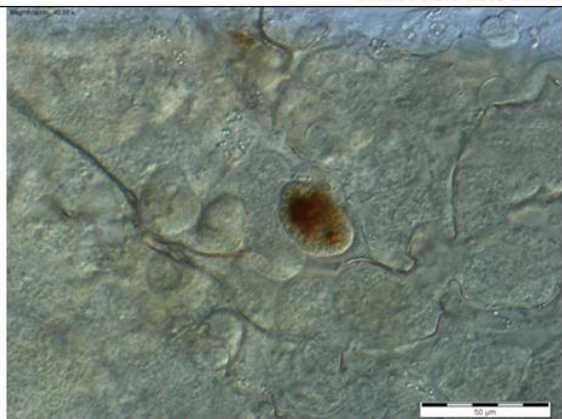
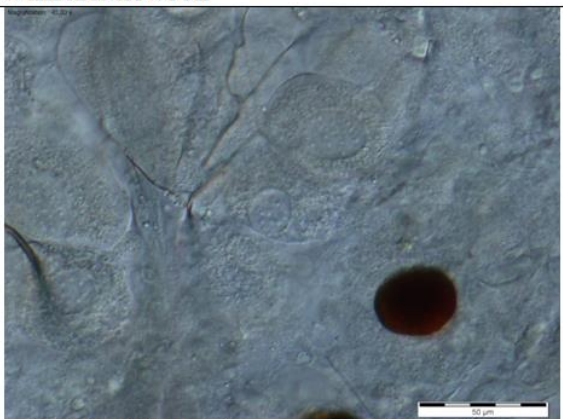
5.2.3 Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych i ich aktywność metaboliczna

Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych

Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych nie różnił się zależnie od statusu reprodukcyjnego. Komórki gruczołowe były okrągłe z centralnie położonym jądrem komórkowym i z dużymi ciemnymi grudkami (Tabela 5).

Tabela 5. Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych zależnie od statusu reprodukcyjnego

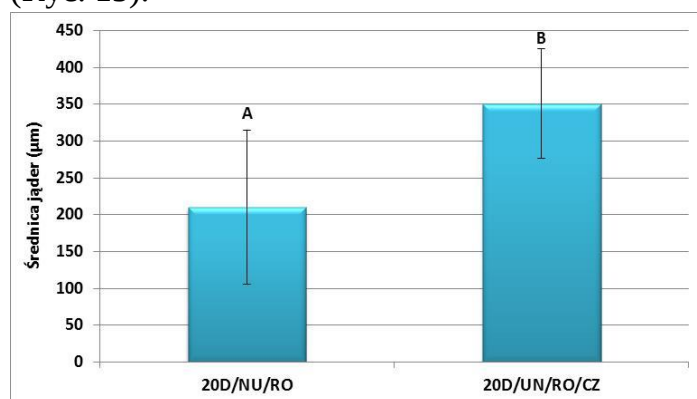
(pow. 40,00x)

20D/NU/RO	20D/UN/RO/CZ
KOMÓRKI GRUCZOŁÓW KIESZONKOWYCH	
	
- okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym, - duże ciemne grudki.	- okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym, - duże ciemne grudki.

20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach;
20D/UN/RO/CZ – matki dwudziestodniowe, unasienione, przetrzymywane w rodzinach, czerwące

Aktywność metaboliczna komórek gruczołów kieszonkowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwące, skutkowałą zwiększeniem średnicy jąder komórkowych gruczołów kieszonkowych, co wiąże się ze wzrostem aktywności metabolicznej tych komórek (Ryc. 15).



20D/NU/RO – matki dwudziestodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach;
20D/UN/RO/CZ – matki dwudziestodniowe, unasienione, przetrzymywane w rodzinach, czerwące; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 15. Średnica jąder komórek gruczołów kieszonkowych zależnie od statusu reprodukcyjnego matek

5.2.4 Analizy biochemiczne gruczołów kieszonkowych

5.2.4.1 Stężenie białka ogólnego

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe skutkowała wzrostem stężenia białka ogólnego w gruczołach kieszonkowych (20D/NU/RO = 0,0407 mg/ml; 20D/UN/RO/CZ = 0,08456 mg/ml).

5.2.4.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowała wzrostem aktywności proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych w gruczołach kieszonkowych (20D/NU/RO = 1,6118 U/mg; 2,5633 U/mg; 3,1968 U/mg; 20D/UN/RO/CZ = 7,052 U/mg; 5,8153 U/mg; 6,3314 U/mg).

5.2.4.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowała wzrostem aktywności inhibitorów proteaz obojętnych i zasadowych w gruczołach kieszonkowych (20D/NU/RO = 1,6986 U/mg; 1,5772 U/mg; 20D/UN/RO/CZ = 15,994 U/mg; 5,145 U/mg), natomiast poziom aktywności inhibitorów proteaz kwaśnych nie zmienił się.

5.2.4.4 Aktywność SOD

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe nie spowodowała istotnych różnic w aktywności SOD w gruczołach kieszonkowych.

5.2.4.5 Aktywność CAT

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe spowodowała wzrost aktywności CAT w gruczołach kieszonkowych (20D/NU/RO = 10,362 U/l; 20D/UN/RO/CZ = 10,871 U/l).

5.2.4.6 Poziom TAC

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe spowodowała wzrost poziomu TAC w gruczołach kieszonkowych (20D/NU/RO = 0,83336 mmol/l; 20D/UN/RO/CZ = 1,0771 mmol/l).

5.2.5 Analizy biochemiczne hemolimfy

5.2.5.1 Stężenie białka ogólnego

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowałą spadkiem stężenia białka ogólnego w hemolimfie (20D/NU/RO = 0,29692 mg/ml; 20D/UN/RO/CZ = 0,18692 mg/ml).

5.2.5.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowałą spadkiem aktywności proteaz kwaśnych i zasadowych w hemolimfie, natomiast aktywność proteaz obojętnych nie zmieniła się istotnie.

5.2.5.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowałą wzrostem aktywności inhibitorów proteaz kwaśnych i zasadowych w hemolimfie. U matek nieunasienionych stwierdzono aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych, podczas gdy w grupie matek unasienionych nieaktywne były inhibitory proteaz obojętnych.

5.2.5.4 Aktywność SOD

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe nie spowodowała istotnych różnic w aktywności SOD w hemolimfie.

5.2.5.5 Aktywność CAT

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowałą znacznym spadkiem aktywności CAT w hemolimfie (20D/NU/RO = 11,553 U/l; 20D/UN/RO/CZ = 1,4789 U/l).

5.2.5.6 Poziom TAC

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowałą znacznym spadkiem poziomu TAC w hemolimfie (20D/NU/RO = 3,1572 mmol/l; 20D/UN/RO/CZ = 0,81261 mmol/l).

5.2.6 Analizy biochemiczne białek powierzchniowych z kutikuli

5.2.6.1 Stężenie białka ogólnego

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowała wzrostem stężenia białka ogólnego na powierzchni kutikuli ($20D/NU/RO = 0,04206 \text{ mg/ml}$; $20D/UN/RO/CZ = 0,22107 \text{ mg/ml}$).

5.2.6.2 Aktywność proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego matek z nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowała wzrostem aktywności proteaz kwaśnych i znacznym spadkiem aktywności proteaz obojętnych i zasadowych na powierzchni kutikuli.

5.2.6.3 Aktywność inhibitorów proteaz kwaśnych, obojętnych i zasadowych

Zmiana statusu reprodukcyjnego z matek nieunasienionych na unasienione czerwiałe, skutkowała znacznym spadkiem aktywności inhibitorów proteaz kwaśnych na powierzchni kutikuli ($20D/NU/RO = 26,405 \text{ U/mg}$; $20D/UN/RO/CZ = 4,3327 \text{ U/mg}$). Ponadto w grupie matek nieunasienionych nieaktywne były inhibitory proteaz obojętnych, a w grupie matek unasienionych inhibitory proteaz zasadowych.

5.3 Wpływ sposobu przetrzymywania

5.3.1 Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego i aktywność metaboliczna enocytów

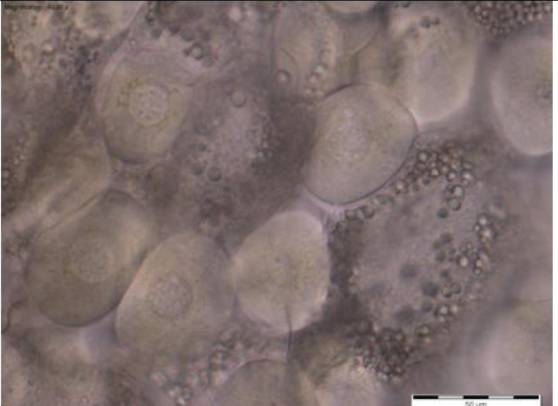
Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego

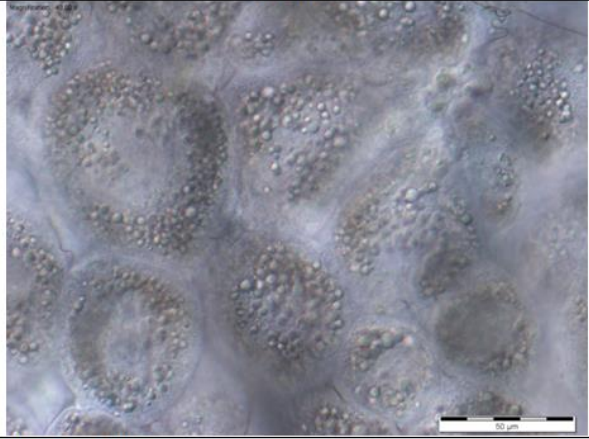
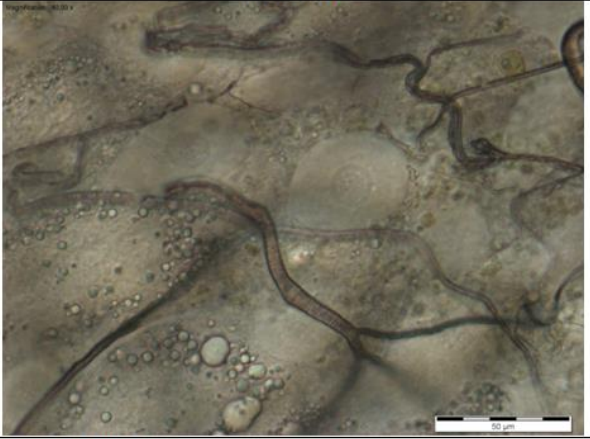
Nie stwierdzono wyraźnego wpływu sposobu przetrzymywania na obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy sternitach. Widoczne były okrągłe, układające się wokół trofocytów, enocyty z centralnie położonymi dużymi jądrami komórkowymi i widocznymi drobnymi, jasnożółtymi ziarnistościami. Zaobserwowano charakterystyczne duże trofocyty z widocznymi kroplami tłuszczu, nierównomiernie rozmieszczonymi u matek przetrzymywanych w klateczkach, natomiast równomiernie rozmieszczonymi na brzegach tych komórek u matek przetrzymywanych w rodzinkach (Tabela 6 A).

Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy tergitech różnił się zależnie od sposobu przetrzymywania matek. U matek przetrzymywanych w klateczkach zaobserwowano duże trofocyty pokryte prawie na całej swojej powierzchni kroplami tłuszczu, tak że enocyty były niewidoczne. Z kolei

u matek przetrzymywanych w rodzinkach widoczne były okrągłe enocyty ułożone wokół trofocytów. W enocytach widoczne były centralnie ułożone jądra komórkowe oraz drobne, jasnożółte ziarnistości. Trofocyty miały duże rozmiary, a krople tłuszczu były rozmieszczone na ich brzegach (Tabela 6 B, C).

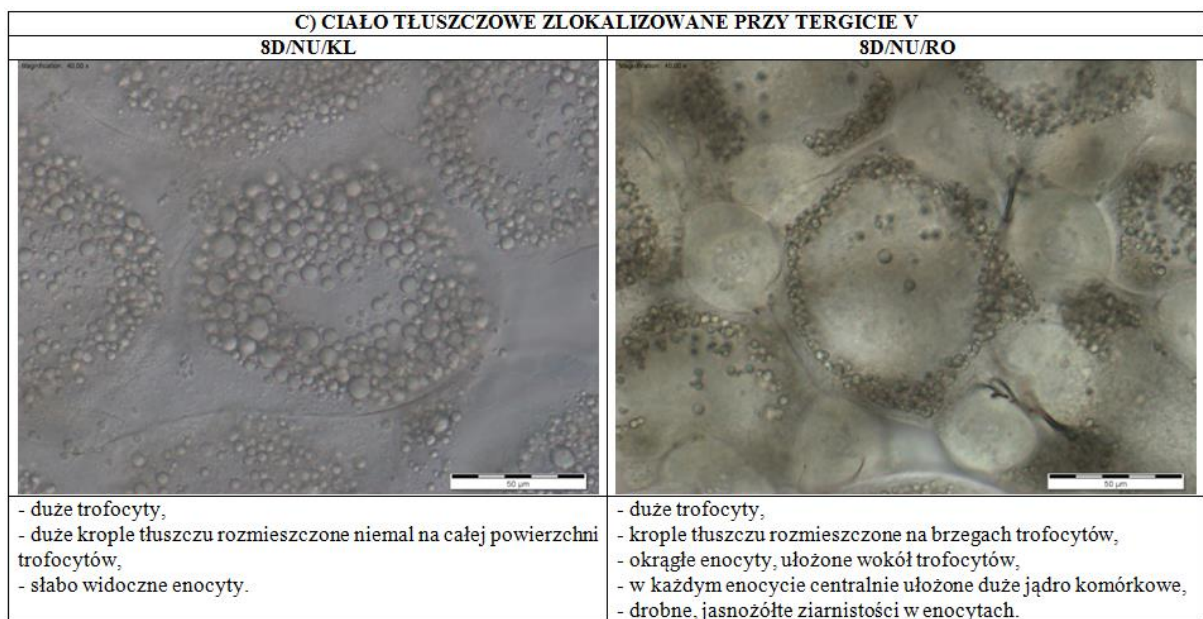
Tabela 6. Obraz morfologiczny komórek ciała tłuszczowego zależnie od miejsca lokalizacji: przy sternitach (A), przy tergicie III (B), przy tergicie V (C) i sposobu przetrzymywania matek (pow. 40,00x)

A) CIAŁO TŁUSZCZOWE ZLOKALIZOWANE PRZY STERNITACH	
8D/NU/KL	8D/NU/RO
	
- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone nierównomiernie w trofocytach, - okrągłe enocyty, układające się wokół trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - drobne, jasnożółte ziarnistości w enocytach,	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - okrągłe enocyty, układające się wokół trofocytów, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - drobne, jasnożółte ziarnistości w enocytach,

B) CIAŁO TŁUSZCZOWE ZLOKALIZOWANE PRZY TERGICIE III	
8D/NU/KL	8D/NU/RO
	
- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na trofocytach, - słabo widoczne enocyty,	- duże trofocyty, - krople tłuszczu rozmieszczone na brzegach trofocytów, - okrągłe enocyty, - w każdym enocycie centralnie ułożone duże jądro komórkowe, - drobne, jasnożółte ziarnistości w enocytach,

8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach;

8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach

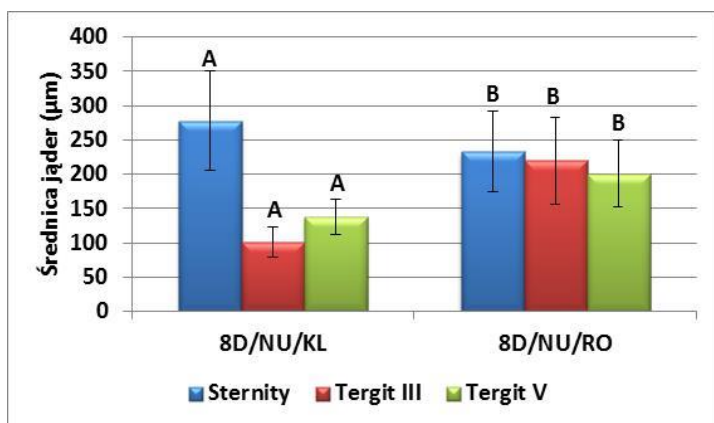


8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach;

8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach

Aktywność metaboliczna enocytów ciała tłuszczowego

U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w tym czasie w rodzinkach, stwierdzono wyższą aktywność metaboliczną enocytów ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy sternitach, natomiast niższą aktywność metaboliczną enocytów ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy tergitech (Ryc. 16).



8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ między poszczególnymi lokalizacjami ciała tłuszczowego zależnie od sposobu przetrzymywania; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

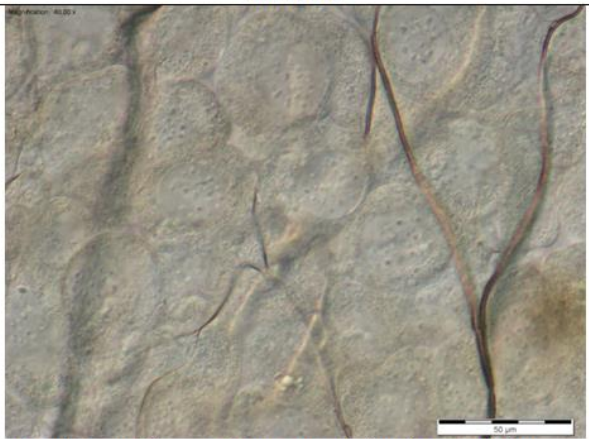
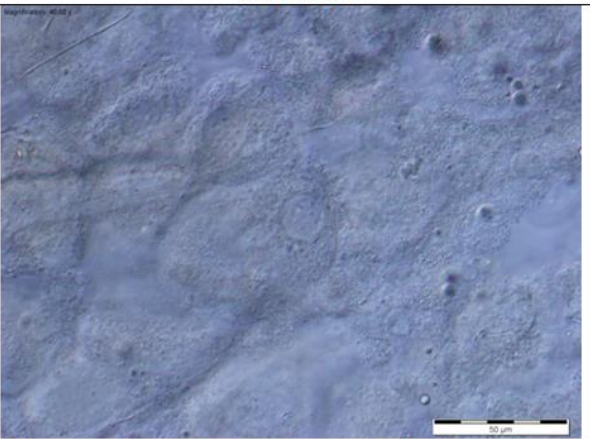
Ryc. 16. Średnica jąder enocytów ciała tłuszczowego zależnie od miejsca jego lokalizacji i sposobu przetrzymywania matek

5.3.2 Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych i ich aktywność metaboliczna

Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych

Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych niezależnie od sposobu przetrzymywania matek, charakteryzował się okrągłymi komórkami gruczołowymi z centralnie położonymi jądrami komórkowymi, których wielkość była zależna od sposobu przetrzymywania. U matek przetrzymywanych w klateczkach jądra komórkowe omawianych tkanek były znacznie większe niż u tych przetrzymywanych w rodzinkach (Tabela 7).

Tabela 7. Obraz morfologiczny komórek gruczołów kieszonkowych zależnie od sposobu przetrzymywania matek (pow. 40,00x)

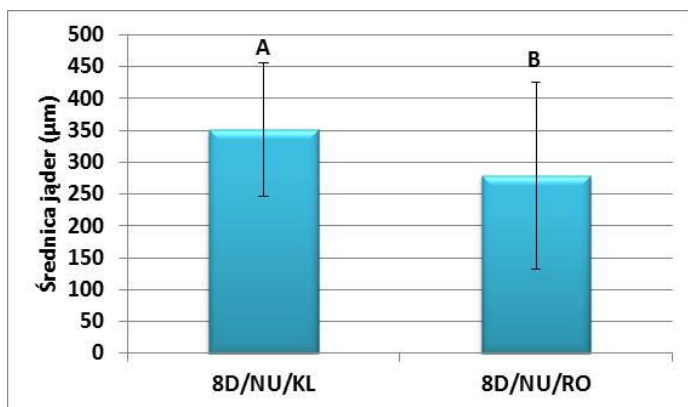
KOMÓRKI GRUCZOŁÓW KIESZONKOWYCH	
8D/NU/KL	8D/NU/RO
	
- okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym.	- okrągłe komórki gruczołowe z centralnie położonym jądrem komórkowym.

8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach;

8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach

Aktywność metaboliczna komórek gruczołów kieszonkowych

U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w tym czasie w rodzinkach, wyższa była aktywność metaboliczna komórek gruczołów kieszonkowych (Ryc. 17).



8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 17. Średnica jąder komórek gruczołów kieszonkowych zależnie od sposobu przetrzymywania matek

Ponadto ani wiek, ani status reprodukcyjny jak też sposób przetrzymywania matek nie wpłynął na wygląd przewodów wyprowadzających komórek gruczołów kieszonkowych (Fot. 1). Ujścia tych przewodów otwierały się na styku wielokątnych komórek (Fot. 1) i miały kształt „lejka” o żółtej barwie (Fot. 2).



(pow. 40,00x)
Fot.1. Przewody wyprowadzające komórek gruczołów kieszonkowych



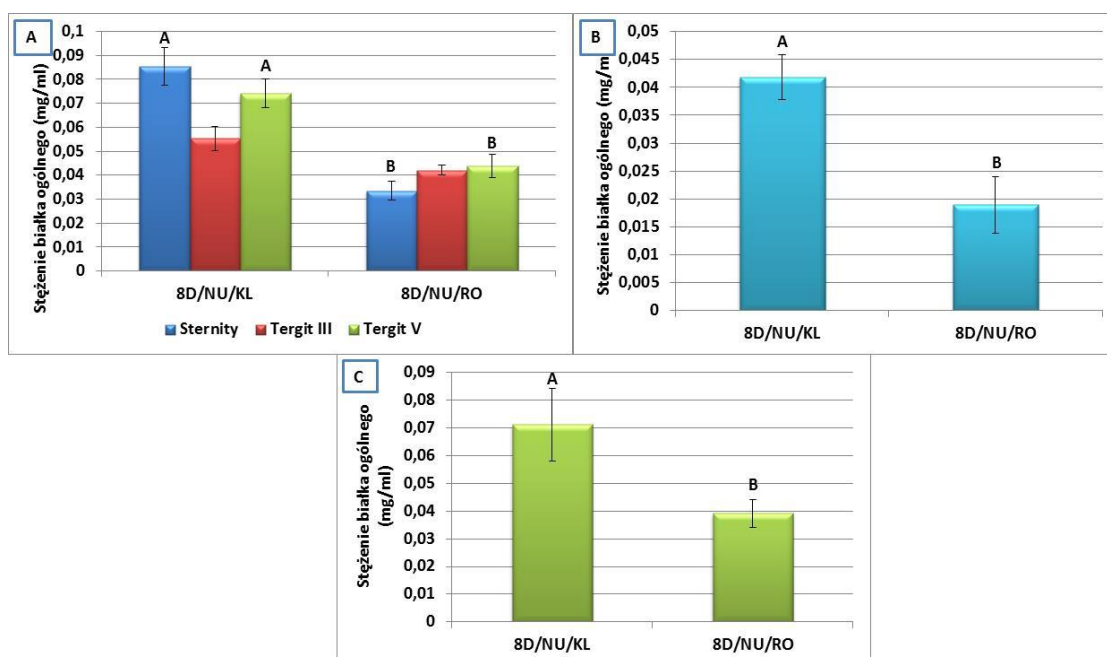
(pow. 60,00x)
Fot. 2. Przewody wyprowadzające komórek gruczołów kieszonkowych
1 – ujścia przewodów wyprowadzających komórek gruczołów kieszonkowych

5.3.3 Analizy biochemiczne tkanek

5.3.3.1 Stężenie białka ogólnego

U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w tym czasie w rodzinkach, stwierdzono wzrost stężenia białka

ogólnego w ciele tłuszczowym (Ryc. 18 A), gruczołach kieszonkowych (Ryc. 18 B) oraz na kutikuli (Ryc. 18 C).

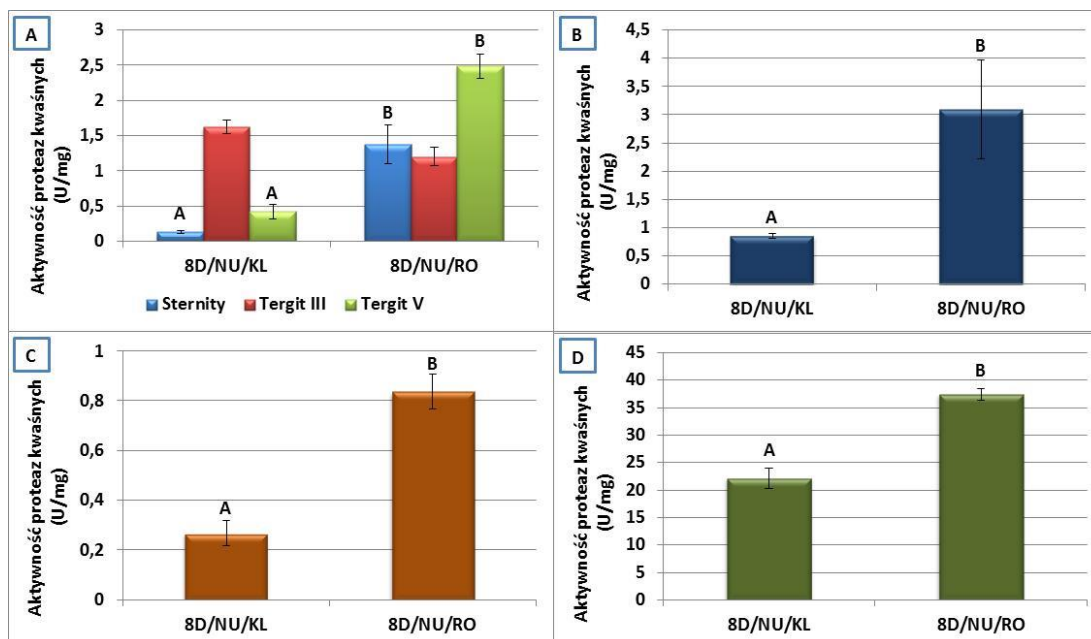


8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinkach; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ zależnie od sposobu przetrzymywania; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 18. Stężenie białka ogólnego w ciele tłuszczowym zależnie od miejsca jego lokalizacji (A), gruczołach kieszonkowych (B) i na powierzchni kutikuli (C), zależnie od sposobu przetrzymywania matek

5.3.3.2 Aktywność proteaz kwaśnych

U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w tym czasie w rodzinkach, stwierdzono obniżenie aktywności proteaz kwaśnych w ciele tłuszczowym (Ryc. 19 A), gruczołach kieszonkowych (Ryc. 19 B), hemolimfie (Ryc. 19 C) oraz na kutikuli (Ryc. 19 D).



8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$ zależnie od sposobu przetrzymywania; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 19. Aktywność proteaz kwaśnych w ciele tłuszczowym zależnie od miejsca jego lokalizacji (A), gruczołach kieszonkowych (B), hemolimfie (C) i na powierzchni kutikuli (D), zależnie od sposobu przetrzymywania matek

5.3.3.3 Aktywność proteaz obojętnych

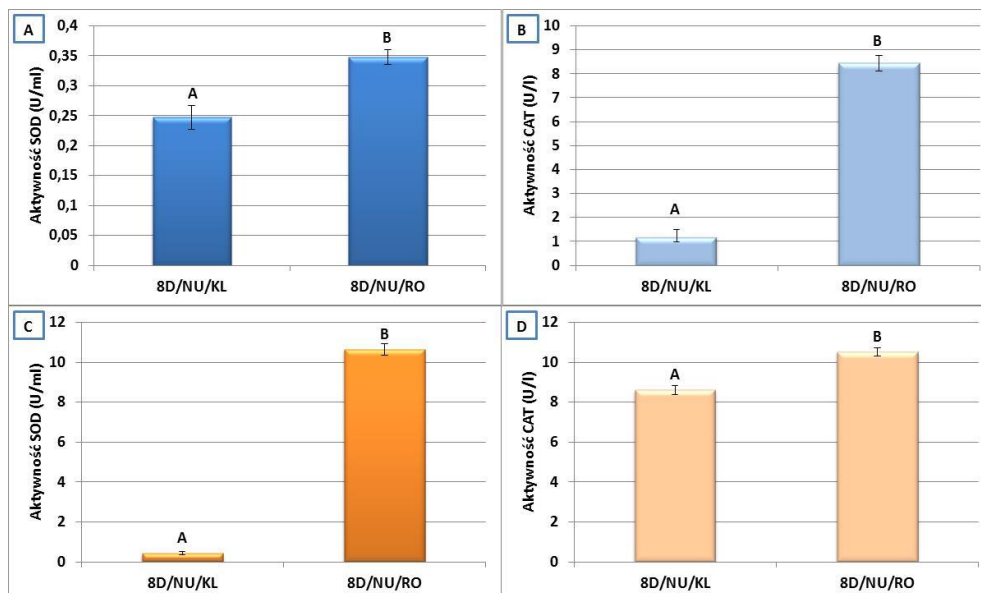
U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w tym czasie w rodzinach, stwierdzono obniżenie aktywności proteaz obojętnych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy sternitach i przy tergicie III oraz w hemolimfie. Natomiast wzrost aktywności tych proteaz stwierdzono w gruczołach kieszonkowych i na powierzchni kutikuli u matek przetrzymywanych w klateczkach.

5.3.3.4 Aktywność proteaz zasadowych

U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w tym czasie w rodzinach, stwierdzono obniżenie aktywności proteaz zasadowych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergitech III i V oraz w gruczołach kieszonkowych. Natomiast wzrost aktywności tych proteaz stwierdzono w hemolimfie i na powierzchni kutikuli u matek przetrzymywanych w klateczkach.

5.3.3.5 Aktywność antyoksydantów enzymatycznych

U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w tym czasie w rodzinach, obniżyła się aktywność SOD i CAT w gruczołach kieszonkowych (Ryc. 20 A, B) oraz w hemolimfie (Ryc. 20 C, D).



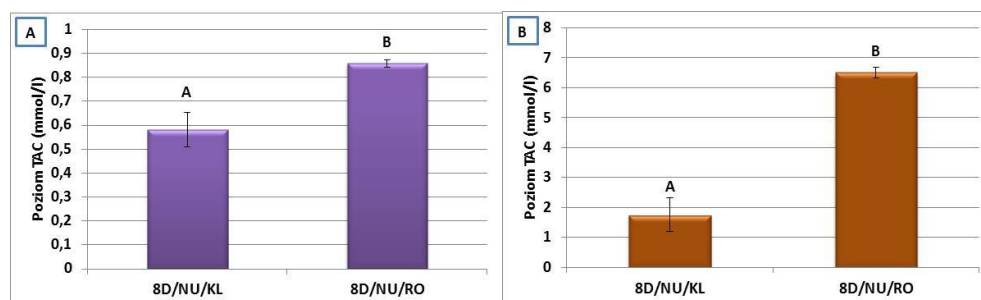
8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach;

A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 20. Aktywność SOD i CAT w gruczołach kieszonkowych (A, B) i w hemolimfie (C, D), zależnie od sposobu przetrzymywania matek

5.3.3.6 Poziom TAC

U matek przetrzymywanych w klateczkach w porównaniu do matek przetrzymywanych w rodzinach, obniżył się poziom TAC w gruczołach kieszonkowych (Ryc. 21 A) i w hemolimfie (Ryc. 21 B).



8D/NU/KL – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w klateczkach; 8D/NU/RO – matki ośmiodniowe, nieunasienione, przetrzymywane w rodzinach; A, B – różnice istotne przy $p \leq 0,01$; wąsy na słupkach przedstawiają odchylenie standardowe

Ryc. 21. Poziom TAC w gruczołach kieszonkowych (A) i w hemolimfie (B), zależnie od sposobu przetrzymywania matek

6. PODSUMOWANIE

Praca ta poprzez **nowatorskie połączenie badań morfologicznych i biochemicznych** potwierdziła hipotezę dotyczącą funkcjonalnego powiązania ze sobą kluczowych tkanek: ciała tłuszczowego, gruczołów kieszonkowych, hemolimfy i kutikuli, biorących udział w kształtowaniu biochemicznej bariery obronnej matek pszczelich. **Novum** tej pracy jest także kompleksowa ocena wpływu takich czynników jak: wiek (matki 1-, 8-, 20-dniowe), status reprodukcyjny (matki nieunasienione/unasienione czerwiące) i sposób przetrzymywania matek (klateczki/rodzinki) na: obraz morfologiczny, aktywność systemu proteolitycznego i antyoksydacyjnego wspomnianych wcześniej tkanek matek pszczelich. Autorka nie spotkała się z pracami, które tak szczegółowo rozpatrywałyby jednoczesny wpływ tak wielu czynników doświadczalnych na te kluczowe tkanki dla odporności matek pszczelich.

Ponadto wyniki tej pracy mogą posłużyć do określenia norm referencyjnych wskaźników biochemicznych matek pszczelich. Autorka uważa, że opracowanie takich norm dla kasty matek jest wskazane z uwagi na łatwiejszą interpretację wyników badań.

Natomiast praktyczny aspekt badań wskazuje, że przetrzymywanie matek w klateczkach skutkuje obniżeniem ich odporności. Dlatego czas przetrzymywania matek w klateczkach powinien być w miarę możliwości ograniczony do minimum.

7. WNIOSKI

1. Odmienny obraz morfologiczny ciała tłuszczowego zlokalizowanego przy sternitach, tergicie III i V oraz związana z lokalizacją tej tkanki różna aktywność metaboliczna enocytów, wskazuje na specyficzne funkcje różnych obszarów ciała tłuszczowego.
2. Zbliżone tendencje dotyczące zmian stężenia białka ogólnego oraz aktywności wskaźników biochemicznych w powiązaniu ze zmianami obrazu morfologicznego, zachodzącymi w ciele tłuszczowym, gruczołach kieszonkowych, hemolimfie i na powierzchni kutikuli matki pszczelej, pod wpływem takich czynników jak wiek czy status reprodukcyjny, wskazują na funkcjonalne połączenie tych tkanek.

3. Wyższa aktywność proteaz kwaśnych w ciele tłuszczowym zlokalizowanym przy tergicie V, w gruczołach kieszonkowych i na powierzchni kutikuli u przygotowujących się do lotów godowych matek w wieku 8 dni, świadczy o wielokierunkowych kaskadach enzymatycznych związanych z wytworzeniem energii w postaci ATP, niezbędnej do odbycia lotów.
4. Najwyższa aktywność metaboliczna komórek gruczołów kieszonkowych u matek w wieku 8 dni, w porównaniu do 1- i 20-dniowych jest związana z odbywanymi w tym wieku lotami godowymi, podczas których wydzielina tych gruczołów jest atraktantem wabiącym trutnie.
5. Wzrost aktywności metabolicznej komórek gruczołów kieszonkowych u matek unasienionych czerwiałych w porównaniu do nieunasienionych, związany jest z procesem czerwienia, a z socjobiologicznego punktu widzenia także z podkreśleniem dominacji reprodukcyjnej matki w rodzinie.
6. Wyższe stężenie białka ogólnego u matek 8-dniowych przetrzymywanych w klateczkach niż u tych przetrzymywanych w rodzinkach oraz obraz morfologiczny ich ciała tłuszczowego podobny do obrazu morfologicznego matek 1-dniowych, wskazuje, że przetrzymywanie matek w klateczkach przez 8 dni nie prowadzi do znacznego zużycia rezerw tłuszczowych, białkowych i węglowodanowych, które dzięki temu mogą być wykorzystywane po poddaniu matki do rodziny.
7. Dalece odbiegające od naturalnych, sztuczne warunki panujące w czasie przetrzymywania matek w klateczkach, nie stwarzają możliwości do prawidłowego działania systemu proteolitycznego i antyoksydacyjnego, przez co powodują obniżenie odporności tych matek. Wskazuje na to niższa aktywność proteaz kwaśnych we wszystkich analizowanych tkankach oraz niższa aktywność enzymatycznych antyoksydantów i niższy poziom TAC w gruczołach kieszonkowych i w hemolimfie matek przetrzymywanych w klateczkach.
8. Czas przetrzymywania matek w klateczkach powinien być skrócony do niezbędnego minimum, gdyż niedobór białka w diecie i stresogenne warunki obniżają ich odporność.