

# Ocena wpływu stresu oksydacyjnego na nasienie zwierząt<sup>1)</sup>

MARTA GOTOWIECKA, WOJCIECH NIŻAŃSKI, AGNIESZKA PARTYKA,  
RAFAŁ STRZEŻEK\*, MAGDALENA KOZIOROWSKA-GILUN\*

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław  
\*Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Michała Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn

Otrzymano 04.06.2014

Zaakceptowano 04.09.2014

Gotowiecka M., Niżański W., Partyka A., Strzeżek R., Koziorowska-Gilun M.  
**Assessment of the influence of oxidative stress on animal semen**

## Summary

Oxidative stress has a significant impact on the quality of the mammalian semen. An excessive amount of reactive oxygen species (ROS) present in the environment of the spermatozoa, which rises as a result of prooxidative-antioxidative balance disorders, leads inter alia to a decrease of semen motility, changes in the conformation of the spermatozoa membrane, acrosome damage, decrease of mitochondrial activity, and appearance of the lipid peroxidation, which can become a cause of reduced fertility or infertility. For this reason the estimation of the influence of oxidative stress on semen can turn out to be a very useful tool in diagnostics of problems with fertility. Nowadays, in order to evaluate the intensity of the oxidative stress it is possible to use the direct method and indirect method that evaluate both the amount of ROS in the semen and the increase of changes in the spermatozoa caused by this compound. A precise analysis of the changes, resulting from prooxidative-antioxidative balance disorders with use of a suitable method of analysis is a base for accurate diagnosis.

**Keywords:** animal's semen, oxidative stress, assessment of oxidative stress

Stresem oksydacyjnym nazywamy zachwianie równowagi pomiędzy nasileniem procesów oksydacyjnych, prowadzących do powstania nadmiernych ilości reaktywnych form tlenu (RFT) w środowisku a działaniem systemu antyoksydacyjnego, stanowiącego naturalną obronę organizmu przed działaniem tych związków (14). RFT mogą powstawać w organizmie jako wynik reakcji zachodzących podczas prawidłowego metabolizmu komórek (28), jako element obronnej reakcji organizmu w procesach immunologicznych oraz jako skutek działania czynników zewnętrznych. Niewielkie ilości RFT są niezbędnym elementem wielu fizjologicznych procesów zachodzących w gametach, takich jak: dojrzewanie plemników, hiperaktywacja i kapacytacja, reakcja akrosomowa oraz fuzja plemnika z oocytą (13). Niemniej jednak RFT produkowane w nadmiarze stanowią istotną przyczynę osłabienia jakości nasienia, powodując uszkodzenia ważnych składników komórkowych, tj. lipidów, białek, DNA czy cukrów (28). Ze względu na dużą reaktywność RFT oraz ich istotny wpływ na jakość plemników

w nasieniu znajduje się swoisty system obronny, który tworzą zarówno elementy enzymatyczne, jak i nie-enzymatyczne. Komponent enzymatyczny systemu antyoksydacyjnego nasienia stanowią: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) i katalaza (CAT) (9, 21, 22, 27). Natomiast na układ niskocząsteczkowy składają się m.in. selen, witamina E, kwas askorbinowy czy glutation (9, 21, 27). Głównym źródłem RFT w nasieniu zwierząt są plemniki oraz leukocyty. W gametach męskich odpowiedzialne za produkcję RFT są głównie 2 elementy: mitochondria, a dokładnie wyciek elektronów z łańcucha oddechowego prowadzący do powstania anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ), który jest najważniejszym generatorem RFT w nasieniu oraz oksydaza błonowa NADPH obecna w główce plemników (5). Dodatkowo występowanie licznych wad morfologicznych w plemnikach, a w szczególności kropli cytoplazmatycznych (kropla cytoplazmatyczna bliższa lub dalsza) i wad wstawki w istotny sposób wpływają na nasilenie produkcji RFT w nasieniu (5). Leukocyty są mniej istotnym źródłem RFT, gdyż system antyoksydacyjny, który jest skupiony głównie w plazmie nasienia, szybko prowadzi do

<sup>1)</sup> Artykuł ten powstał jako część projektu wspieranego przez Narodowe Centrum Nauki, grant nr N N308 573339.

inaktywacji produkowanych przez nie wolnych rodników. Dopiero znaczna leukocytospermia, na poziomie  $1 \times 10^6$  leukocytów/ml (7), oraz przeprowadzanie procedur biotechnicznych na nasieniu, prowadzących do usunięcia plazmy nasienia, mogą w istotny sposób naruszać równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną nasienia (1). Rozwijający się stres oksydacyjny szybko prowadzi do znacznego spadku przeżywalności plemników, powodując pogorszenie jakości nasienia, dlatego ocena jego nasilenia może być pomocnym narzędziem w diagnostyce przyczyn obniżonej płodności oraz niepłodności u samców.

### Wykrywanie zawartości reaktywnych form tlenu w nasieniu

Zawartość RFT w nasieniu można zmierzyć zarówno metodami bezpośrednimi, jak i pośrednimi.

Do metod bezpośrednich służących do oceny zawartości RFT w nasieniu zaliczamy między innymi: radiolizę impulsową oraz spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (17). Metoda radiolizy impulsowej jest techniką stosowaną w badaniach radiacyjnych, polegającą na pomiarze, przy pomocy metod optycznych, poziomu absorpcji produktów radiolizy, powstałych w wyniku działania na badany materiał impulsów promieniowania pochodzących z akceleratora elektronów (30). Ze względu na krótki okres życia RFT do radiolizy impulsowej używa się najczęściej akceleratorów o wysokiej częstotliwości, tzw. akceleratorów z wędrującą falą, pozwalających na wygenerowanie impulsów o bardzo krótkim czasie trwania. Istotną różnicę pomiędzy absorpcją światła a absorpcją promieniowania radiacyjnego stanowi fakt, że w przypadku badania roztworów przy fotolizie błyskowej energia pochłaniana jest przez substancję rozpuszczoną, podczas gdy przy radiolizie impulsowej w sposób niespecyficzny przez rozpuszczalnik (30). Metoda ta nie tylko umożliwia detekcję RFT, ale również śledzenie dynamiki reakcji przebiegających z ich udziałem.

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego, nazywana także spektroskopią elektronowego spinowego rezonansu, jest metodą umożliwiającą identyfikację m.in. wolnych rodników i związków zawierających niesparowane elektrony, polegającą na ocenie spinów elektronów (31). Badany materiał poddaje się najczęściej działaniu promieniowania mikrofalowego o stałej częstotliwości oraz zmiennego pola magnetycznego. Aby umożliwić dokładną ocenę układów biologicznych zawierających wolne rodniki, ze względu na ich fizjologicznie niskie stężenie w organizmie, zaprojektowano specjalne „pułapki spinowe”, czyli związki, które łatwo i efektywnie tworzą z wolnymi rodnikami trwałe formy (31). Dużą zaletą tej metody jest fakt, że pozwala ona na ocenę zarówno reakcji chemicznych, jak i procesów fizycznych, nie ingerując w ich przebieg.

Ze względu na konieczność posiadania specjalistycznego sprzętu, krótki okres półtrwania RFT w środowisku, nie zawsze wystarczająco dużą objętość badanej próbki oraz konieczność używania do oznaczeń świeżego materiału, metody bezpośrednie są w praktyce rzadko stosowane do oznaczania stężenia RFT w nasieniu.

Najbardziej rozpowszechnioną metodą pośrednią służącą do oceny stężenia RFT w nasieniu jest chemiluminescencja, polegająca na ocenie emisji fal świetlnych powstających podczas niektórych reakcji chemicznych, umożliwiającą określenie zarówno populacji zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowej tych związków, w zależności od użytego substratu (17). Ocenę przeprowadza się przy użyciu czułych „sond”, takich jak np. lucygenina czy luminol, który pod wpływem RFT łatwo ulega utlenieniu w neutralnym pH (17). Użycie luminolu umożliwia ocenę obu populacji RFT: zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej, podczas gdy lucygeniny tylko populacji zewnątrzkomórkowej (17).

Do wykrywania stresu oksydacyjnego w nasieniu można także stosować fluorescencję. Podstawowym barwnikiem służącym do tego celu jest carboxy- $H_2DCFDA$ , czyli zredukowana, zacetylowana forma fluoresceiny, pozwalająca na ocenę wewnątrzkomórkowej produkcji RFT (18). Substancja ta w pierwotnej formie nie emituje fal świetlnych. Zasada działania metody z użyciem carboxy- $H_2DCFDA$  opiera się na zjawisku pojawienia się zielonej fluorescencji w cząsteczce po odłączeniu od niej grup acetylowych. Podjednostki te są odłączane przez wewnątrzkomórkowe esterazy lub na drodze oksydacji wywołanej aktywnością RFT.

### Ocena parametrów ruchowych plemników

Pierwszym objawem rozwoju stresu oksydacyjnego w nasieniu jest spadek ruchliwości plemników (6) spowodowany wyczerpywaniem się zapasów ATP w komórce oraz zahamowaniem fosforylacji białek aksonemy (3), za które odpowiedzialne są przede wszystkim anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) oraz nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ). Z tego względu dokładna analiza parametrów ruchowych plemników może być bardzo dobrą i czułą metodą służącą do wykrywania pierwszych symptomów świadczących o pojawieniu się stresu oksydacyjnego w nasieniu. Najlepszą metodą analizy ruchliwości gamet męskich jest ocena wspomagana komputerowo (CASA), od ponad 30 lat używana w andrologii. Pozwala ona na szybkie, dokładne i obiektywne przeprowadzenie badania. Na rynku dostępnych jest wiele komercyjnych systemów służących do komputerowej oceny nasienia, tj. analizator ruchu Strömberg-Mika Cell, Hobson Sperm Tracker, Cell Tracks System, Hamilton-Thorne i inne, jednak zasada ich działania jest taka sama (24). Każdy system składa się z mikroskopu kontrastowo-fazowego, kamery, stolika grzewczego, przetwornika obrazu oraz komputera (24). Głównym zadaniem systemu jest ocena ruchliwości plemników poprzez odtwarzanie tra-

jektorii ich ruchu. Pozwala to w krótkim czasie uzyskać wiele informacji na temat odsetka plemników ruchliwych, odsetka plemników o ruchu postępowym oraz obszerną bazę danych na temat parametrów odnoszących się do szybkości ruchu komórek i liniowości jego toru (19). Zauważalny spadek ruchliwości plemników jest jedną z pierwszych oznak prognostycznych stresu oksydacyjnego, przez co może stać się pomocnym narzędziem diagnostycznym.

### **Ocena zmian strukturalnych oraz funkcjonalnych plemników wywołanych przez stres oksydacyjny**

Do oceny zmian strukturalnych oraz funkcjonalnych plemników stosuje się tradycyjne metody mikroskopowe (12) oraz cytometrię przepływową (12, 18). Cytometria przepływowa jest jedną z najczęściej stosowanych w andrologii metod analitycznych. Jej zaletą jest możliwość przeprowadzenia obiektywnej oceny dużej, reprezentatywnej ilości elementów komórkowych, co daje bardzo dużą możliwość analityczną. W połączeniu z barwieniami fluorescencyjnymi cytometria przepływowa pozwala na ocenę rodzaju fluorescencji oraz intensywności zabarwienia badanych komórek. Dzięki użyciu różnych fluorochromów lub związków skoniugowanych z fluorochromami możliwa jest dokładna i obiektywna ocena oraz monitorowanie zmian zachodzących w nasieniu, tj. ocena: żywotności plemników, zmian zachodzących w błonie komórkowej plemników zarówno w przebiegu procesów fizjologicznych (kapacytacja), jak i patologicznych (apoptoza), nasilenia peroksydacji lipidów, integralności DNA i innych (15, 18). Daje to m.in. możliwość szybkiego i precyzyjnego określenia stopnia nasilenia zmian w plemnikach, wywołanych działaniem stresu oksydacyjnego.

### **Ocena nasilenia peroksydacji lipidów w błonie komórkowej plemników**

Podstawowym procesem wywołanym przez obecność w środowisku RFT i prowadzącym do poważnych uszkodzeń komórek jest peroksydacja lipidów (9). Ze względu na budowę błony komórkowej plemników, charakteryzującą się wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych, gamety męskie są szczególnie narażone na ten rodzaj uszkodzeń (12). Peroksydacja lipidów jest łańcuchowym, wolnorodnikowym procesem utleniania lipidów, prowadzącym do powstania nadtlenków lipidów oraz aldehydów (9). Jest to istotne dla jakości nasienia zjawisko, w wyniku którego dochodzi do zmiany płynności oraz utraty integralności błony komórkowej plemników, co zaburza, a w skrajnych przypadkach uniemożliwia spełnianie fizjologicznych funkcji przez gamety męskie (9). Prostą i skuteczną metodą oceny nasilenia peroksydacji lipidów w nasieniu jest test z użyciem kwasu tiobarbiturowego (TBA) (12). Wykorzystuje on zjawisko zachodzenia barwnej reakcji kwasu z dialdehydem malonowym, powstającym na drodze dekompozycji

wodoronadtlenków lipidów pod wpływem takich czynników, jak kwaśne pH, wysoka temperatura oraz obecność śladowych ilości metali, wpływających pozytywnie na szybkość tej reakcji (2, 12). Poziom dialdehydu malonowego określa się metodą kolorymetryczną.

Inną metodą pozwalającą na oznaczenie nasilenia peroksydacji lipidów w komórkach jest test z użyciem barwnika fluorescencyjnego  $C_{11}$ BODIPY<sup>581/591</sup>, który łatwo wnika do błony komórkowej plemników (4). W metodzie tej wykorzystuje się wrażliwość tego fluoroforu na utlenianie. Wyjściowo  $C_{11}$ BODIPY<sup>581/591</sup> emituje światło w zakresie widma czerwonego o długości fali około 590 nm. W odpowiedzi na utlenianie reszty wielonienasyconego butadienu, będącego częścią tego barwnika, dochodzi do zmiany długości fali emitowanego światła na 510 nm, co skutkuje pojawieniem się zielonej fluorescencji. Zmiana długości fali emitowanego światła może być łatwo monitorowana i oceniona za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej czy cytometrii przepływowej (4).

### **Ocena żywotności plemników**

Zachowanie ciągłości błony komórkowej jest jednym z niezbędnych warunków dla przeżycia komórek. Stres oksydacyjny oddziałujący na plemniki prowadzi m.in. na drodze peroksydacji lipidów do utraty integralności błony komórkowej, co w dalszej perspektywie skutkuje śmiercią tych komórek. Popularnym barwieniem fluorescencyjnym stosowanym w andrologii do oceny żywotności plemników oraz związanej z nią ciągłości błon komórkowych jest złożone barwienie z użyciem fluorochromów SYBR-14 oraz jodku propidyny (PI) (18). Zaletą tego barwienia w porównaniu z innymi metodami służącymi do oceny żywotności plemników jest fakt, że składniki rozrzedzalników stosowanych w procedurach konserwacji nasienia nie wpływają na jego wynik. SYBR-14 po związaniu się z jądrem komórkowym żywych plemników emituje światło o długości fali 518 nm, powodując tym samym pojawienie się jasnej zielonej fluorescencji (8, 10). W sytuacji, gdy komórki zaczynają tracić integralność błony komórkowej, do ich wnętrza zaczyna wnikać PI, powodując wypieranie fluorochromu SYBR-14 i pojawienie się czerwonej fluorescencji w zakresie długości fali 535-617 nm (10). Zmiana koloru fluorescencji rozpoczyna się w tylnej części główki i postępuje ku przodowi. Na podstawie tego barwienia w ejakulacie można wyróżnić 3 populacje komórek: plemniki żywe, o zachowanych parametrach ruchowych (SYBR-14+/PI-), komórki zamierające (SYBR-14+/PI+) oraz plemniki martwe (PI+/SYBR-14-), dające dokładne informacje na temat żywotności komórek (10).

### **Ocena struktury chromatyny**

Dzięki swojej wysokiej reaktywności RFT mogą bezpośrednio oddziaływać na DNA komórki, powodując uszkodzenia materiału genetycznego plemników.

Jedną z najczęściej stosowanych w andrologii metod oceny uszkodzeń DNA w plemnikach jest barwienie fluorescencyjne z użyciem oranżu akrydyny – OA (tzw. Sperm Chromatin Structure Assay – SCSA) służące do oceny struktury chromatyny, przeprowadzane najczęściej z użyciem cytometrii przepływowej. Uważa się, że SCSA jest najbardziej dokładną oraz powtarzalną metodą pozwalającą na ocenę fragmentacji DNA w gametach samców oraz wykrycie nieprawidłowych plemników, w których w przebiegu kondensacji chromatyny doszło do zaburzenia procesu zamiany histonów na protaminy (8, 23). Oranż akrydyny wiąże się z kwasami nukleinowymi i po wzbudzeniu światłem o długości fali 488 nm powoduje pojawienie się fluorescencji o barwie zielonej (o długości fali 515-530 nm), w przypadku łączenia się z nieuszkodzoną, podwójną helisą oraz czerwonej (o długości fali 630-640 nm) w przypadku łączenia się z pojedynczą nicią kwasu nukleinowego (18). Zasada metody opiera się na fakcie, że w kwaśnym środowisku, w sytuacji gdy doszło do uszkodzenia lub osłabienia struktury chromatyny, nić DNA łatwo ulega denaturacji, w wyniku której powstają jednoniciowe fragmenty DNA (25). Na podstawie testu SCSA można wyróżnić 3 populacje komórek: plemniki prawidłowe, plemniki dojrzałe wykazujące fragmentację DNA określaną za pomocą tzw. indeksu fragmentacji DNA (DFI – DNA fragmentation index) oraz plemniki niedojrzałe, w których nie doszło do kondensacji chromatyny (HDS – high DNA stainability) (25). Oranż akrydyny można również stosować w połączeniu z oceną preparatów przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego – tzw. acridine orange test (AOT) (29).

### Ocena nasilenia apoptozy

Jednym z procesów indukowanych przez RFT jest także apoptoza. W warunkach fizjologicznych jest to jeden z procesów związanych z rozwojem organizmu, polegający na „zaprogramowanej” śmierci komórki. Dzięki swojej dużej reaktywności RFT mogą doprowadzić do uszkodzenia błon mitochondrialnych plemników, skutkującego uwolnieniem cytochromu C i aktywacją kaspaz (5) oraz czynnika aktywującego apoptozę (AIF) uszkadzającego bezpośrednio DNA komórki i tym samym doprowadzić do śmierci komórki na drodze apoptozy (17). W andrologii stosuje się kilka różnych metod oceny zmian apoptotycznych w plemnikach, do których należą m.in.: 1) ocena subtelnych zmian w błonie komórkowej typowych dla wczesnej apoptozy, 2) wykrywanie aktywacji kaspaz (FLICA – fluorochrome labeled inhibitors of caspases), 3) wykrywanie fragmentacji DNA oraz 4) ocena potencjału błonowego mitochondriów.

Jednym z pierwszych objawów apoptozy w komórkach jest pojawienie się subtelnych zmian w błonie komórkowej plemników. Jedną z nich jest utrata charakterystycznej asymetrii błony komórkowej przejawiająca się m.in. poprzez eksternalizację fosfatydy-

loseryny (26), przebiegająca bez naruszenia integralności plazmolemy. Do wykrywania przemieszczenia fosfatydyloseryny stosuje się barwienie z użyciem aneksyny V, białka zależnego od jonów wapniowych o dużym powinowactwie do fosfatydyloseryny, skoniugowanego np. z fluorochromem izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC), dającego zieloną fluorescencję w zakresie długości fali 488-499 nm oraz PI. Dzięki tej metodzie można wyróżnić 4 populacje komórek: plemniki żywe o prawidłowej konformacji błony komórkowej (Annexin-V-/PI-), komórki z objawami wczesnej apoptozy (Annexin-V+/PI-), plemniki w późnej apoptozie (Annexin-V+/PI+) oraz komórki martwe (Annexin-V-/PI+) (26). Ocenę subtelnych zmian w błonie komórkowej można również przeprowadzić przy pomocy barwnika YO-PRO-1. Fluorochrom ten emituje zieloną fluorescencję o długości fali 530 nm (16). Przy użyciu barwienia z YO-PRO-1 oraz PI lub homodimeru bromku etydyny (Eth) można również wyróżnić 4 populacje komórek: plemniki żywe (YO-PRO-1-/PI-), komórki we wczesnym stadium apoptozy (YO-PRO-1+/PI-), w których doszło do zmian konformacji błony komórkowej powodujących, że błona ta staje się częściowo przepuszczalna, plemniki we wczesnym (YO-PRO-1+/PI+) oraz późnym (YO-PRO-1-/PI+) stadium nekrozy (20). Innym fluorochromem, pozwalającym na śledzenie subtelnych zmian w zewnętrznej warstwie błony komórkowej plemników, ale przebiegających na wczesnym etapie kapacytacji, jest merocyjanina 540 (18). Barwienie z jej użyciem pozwala na odróżnienie procesu fizjologicznego, w którym dochodzi do zmiany konformacji błony, od patologicznego, jakim jest apoptoza.

Do wykrywania w komórkach aktywnych kaspaz stosuje się często marker FITC-VAD-FMK, składający się z mogącego przenikać przez błony komórkowe białka, będącego inhibitorem kaspaz skoniugowanego z fluorochromem FITC (20). Po wnikięciu do komórki i związaniu się markera z aktywnymi kaspazami, barwnik emituje fale o długości 535 nm, powodując pojawienie się zielonej fluorescencji. W połączeniu z dodatkowym fluorochromem, tj. jodkiem propidyny czy homodimerem etydyny, na podstawie tej metody barwienia można wyróżnić 4 populacje komórek: plemniki żywe bez cech apoptozy (ZVAD-/PI-), komórki żywe, w których doszło do aktywacji kaspaz (ZVAD+/PI-), komórki martwe wykazujące aktywność kaspaz (ZVAD+/PI+) oraz plemniki martwe (ZVAD-/PI+) (20).

Podczas apoptozy w komórkach dochodzi do fragmentacji DNA na drodze endonukleolitycznej degradacji. Metodą pozwalającą na ocenę tych zmian jest test „TUNEL” (terminal deoxynucleotidyl transferze dUTP nick end-labeling) z użyciem egzogennej końcowej transferazy deoksynukleotydylowej TdT, przyłączającej się do końców 3' fragmentów nici DNA, skoniugowanej z FITC (26). Ważnym elementem protokołu barwienia jest utrwalenie komórek przy

użyciu 1% formaldehydu, znacznie ograniczającego wypłukiwanie niskocząsteczkowych fragmentów DNA powstających w przebiegu apoptozy, które są lepsze od fragmentów DNA powstających np. przy martwicy komórek czy pod wpływem promieniowania jonizującego (26). Metoda ta pozwala na wyróżnienie komórek nekrotycznych i apoptotycznych, które są preferencyjnie znakowane w tym barwieniu (TUNEL+) oraz komórek żywych (TUNEL-). Ocena fragmentacji DNA jest powszechnie stosowaną metodą diagnostyczną w medycynie ludzkiej, a na rynku dostępne są już komercyjne testy do jej analizy.

Potencjał błon mitochondrialnych plemników można ocenić przy użyciu barwników potencjometrycznych, tj. JC-1 czy rodaminy 123. W przypadku komórek żywych dochodzi do wychwytu tych barwników i ich akumulacji w komórce, której stopień jest mierzony za pomocą intensywności fluorescencji (26). JC-1 po wzbudzeniu emituje fale świetlne o długości od 529 nm (zielona fluorescencja) do 590 nm (pomarańczowa fluorescencja) w zależności od potencjału błon mitochondrialnych (11). Metoda z użyciem barwnika JC-1 pozwala na wyróżnienie 3 populacji plemników: komórek o wysokim potencjale błonowym mitochondriów, w których JC-1 tworzy multimeryczne agregaty (pomarańczowa fluorescencja), komórek o niskim potencjale błony mitochondriów, w których barwnik ten występuje w postaci monomerów (zielona fluorescencja) oraz plemników o średnim potencjale błonowym mitochondriów (fluorescencja pomarańczowo-zielona) (20).

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem wpływającym w istotny sposób na jakość nasienia samców. Reaktywne formy tlenu oddziałują bezpośrednio na elementy budulcowe plemników, tj. lipidy, białka czy kwasy nukleinowe, powodując nie tylko upośledzenie funkcji komórek, ale także w zaawansowanych przypadkach ich śmierć. Podstawowymi objawami występowania stresu oksydacyjnego w nasieniu są: zwiększona zawartość RFT, spadek ruchliwości plemników, nasilenie peroksydacji lipidów, pojawienie się uszkodzeń DNA w komórkach oraz objawów świadczących o aktywacji szlaków apoptotycznych, które nieuchronnie prowadzą do śmierci plemników. Obecnie istnieje wiele metod pozwalających zarówno na ocenę zawartości RFT w nasieniu, jak i indukowanych przez nie zmian w plemnikach, a szybka i dokładna ocena nasilenia stresu oksydacyjnego w nasieniu jest ważnym elementem w diagnostyce i leczeniu przypadków obniżonej płodności oraz niepłodności u samców.

### Piśmiennictwo

1. Aitken R. J.: Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. fertil. dev.* 1995, 7, 659-668.
2. Aitken R. J., Clarkson J. S., Fishel S.: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. reprod.* 1989, 40, 183-197.
3. Aitken R. J., Harkiss D., Buckingham D. W.: Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 1993, 35, 302-315.

4. Aitken R. J., Wingate J. K., De Iulius G. N., McLaughlin A.: Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol. Hum. Reprod.* 2007, 13, 203-211.
5. Ball B. A.: Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 2008, 107, 257-267.
6. Baumber J., Ball B. A., Gravance C. G., Medina V., Davies-Morel M. C.: The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 2000, 21, 895-902.
7. Evenson D. P.: Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Meth. Mol. Biol.* 2013, 927, 147-164.
8. Evenson D. P., Jersten K., Larson L., Jost L. K.: Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparison With Other Techniques. *J. Androl.* 2002, 23, 25-43.
9. Frączek M., Kurpisz M.: System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2005, 59, 523-534.
10. Garner D. L., Johnson L. A.: Viability Assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. reprod.* 1995, 53, 276-284.
11. Hossain M. S., Johannisson A., Wallgren M., Nagy S., Siqueira A. P., Rodriguez-Martinez H.: Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J. Androl.* 2011, 13, 406-419.
12. Kaur Bansal A., Bilaspuri G. S.: Impact of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet. Med. Int.* 2011, art ID 686137.
13. Kothari S., Thompson A., Agarwall A., du Plessis S. S.: Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J. Exp. Biol.* 2010, 48, 425-435.
14. Kulbacka J., Saczko J., Chwilkowska A.: Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol. Merk. Lek.* 2009, XXVII, 157, 44-47.
15. Lamirande E. de, Gagnon C.: Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.* 1995, 10, 15-21.
16. Mahfouz R. Z., du Plessis S. S., Aziz N., Sharma R., Sabanegh E., Agarwal A.: Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertil. Steril.* 2010, 93, 814-821.
17. Makker K., Agarwal A., Sharma R.: Oxidative stress & male infertility. *Indian J. Med. Res.* 2009, 129, 357-367.
18. Niżański W., Partyka A., Rijseelaere T.: Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reprod. Dom. Anim.* 2012, 47, 1-7.
19. Niżański W., Twardoń J., Klimowicz M.: Komputerowo wspomaganą analizą jakości nasienia – zasady i możliwości. *Życie wet.* 2006, 81, 121-125.
20. Ortega-Ferrusola C., Sotillo-Galán Y., Varela-Fernández E., Gallardo-Bolaños J. M., Muriel A., González-Fernández L., Tapia J. A., Peña F. J.: Detection of "Apoptosis-Like" Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm. *J. Androl.* 2008, 29, 213-221.
21. Partyka A., Lukaszewicz E., Niżański W.: Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 2012, 77, 1497-1504.
22. Partyka A., Niżański W., Bajzert J., Lukaszewicz E., Ochota M.: The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. *Cryobiology* 2013, 67, 2, 132-136.
23. Perelman A., Wachtel C., Cohen M., Haupt S., Shapiro H., Tzur A.: JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease* (2012) 3, e430; doi:10.1038/cddis.2012.171 Published online 22 November 2012.
24. Rijseelaere T., Van Somme A., Maes D., Niżański W.: Computer Assisted Sperm Analysis in Dogs and Cats: An Update After 20 years. *Reprod. Dom. Anim.* 2012, 47, 1-4.
25. Rybar R., Faldikova L., Faldyna M., Machatkova M., Robes J.: Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in Czech Republic. *Vet. Med. Czech.* 2004, 49, 1-8.
26. Smolewski P., Darzynkiewicz Z.: Współczesne metody badania apoptozy. *Acta Haematol. Pol.* 2003, 34, 35-47.
27. Strzeżek R., Kozirowska-Gilun M., Kowalówka M., Strzeżek J.: Characteristic of antioxidant system in a dog semen. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, 12, 55-60.
28. Ścibior D., Czeczot H.: Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2006, 60, 170-180.
29. Tejada R. I., Mitchell J. C., Norman A., Marik J. J., Friedman S.: A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.* 1984, 42, 87-91.
30. Truscott T. G.: Pulse radiolysis. *Photosensitisation NATO ASI Series* 1988, 15, 39-51.
31. Zawada K.: Zastosowanie spektroskopii EPR w farmacji i medycynie. *Farm. Pol.* 2009, 65, 224-228.

Adres autora: dr hab. Wojciech Niżański, prof. UP, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław; e-mail: wojciech.nizanski@up.wroc.pl