

Specyfika działania systemu antyoksydacyjnego nasienia knura¹⁾

ALEKSANDRA ORZOŁEK, KATARZYNA MIETELSKA, PAWEŁ WYSOCKI

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn

Otrzymano 12.05.2015

Zaakceptowano 22.07.2015

Orzołek A., Mietelska K., Wysocki P.

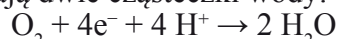
Function of the antioxidant system in boar semen

Summary

An excessive generation of reactive oxygen species (ROS) in boar semen leads to a reduced motility and fertilizing ability of spermatozoa. Boar spermatozoa, because of a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in their structure, are highly sensitive to lipid peroxidation (LPO). This process, induced by ROS generation, causes irreversible changes in the conformation and integrity of plasmalemma. The boar's reproductive system includes a special antioxidant system consisting of enzymatic components and antioxidants of low molecular weight. The most active of antioxidant enzymes present in boar semen is superoxide dismutase (SOD). SOD transforms superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2). Because H_2O_2 can easily diffuse across the membranes, it is most harmful to boar spermatozoa. Given the low content of antioxidants of low molecular weight (e.g. L-gluthatione or L-ergothioneine) and the absence of catalase (CAT) activity in boar semen, there must be other mechanisms responsible for the scavenging of hydrogen peroxide and other ROS. This function is probably accomplished mainly by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), enzymes of tioredoxin (TRX) and peroxiredoxin (PRDX) groups, as well as by paraoxonase type 1 and 2 (PON-1 and PON-2).

Keywords: boar semen, ROS, antioxidant enzymes

Tlen jest pierwiastkiem warunkującym życie organizmów aerobowych. Z jednej strony, poprzez oddychanie umożliwia komórkom uzyskanie dużo większych ilości energii niż w przypadku fermentacji, jednak, z drugiej strony, uszkadza składniki komórek. Tlen cząsteczkowy jest utleniaczem. Reaguje ze związkami organicznymi, pobierając od nich elektrony i ostatecznie ulegając redukcji. Całkowita redukcja tlenu wyraża się poprzez przyłączenie do cząsteczki czterech elektronów i czterech protonów, w wyniku czego powstają dwie cząsteczki wody:



Reakcja ta jest egzoergiczna, a produkt reakcji, czyli woda, jest związkiem niereaktywnym wobec komórki. Niestety, cząsteczka tlenu nie zawsze ulega całkowitej, czteroelektronowej redukcji. W określonych warunkach może ona ulegać przekształceniom w toksyczne, reaktywne formy tlenu (RFT). Najczęściej powstającymi RFT o budowie wolnych rodników są: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik wodoronadtlenkowy ($HO_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), tlenek azotu (NO^{\cdot}), dwutlenek azotu (NO_2^{\cdot}) oraz rod-

nik nadrtlenkowy (ROO^{\cdot}). Do RFT zaliczają się również: tlen singletowy (1O_2), ozon (O_3) oraz nadrtlenek wodoru (H_2O_2), które nie posiadają niesparowanego elektronu. RFT oraz ich metabolity atakują głównie wiązania występujące w DNA, lipidach i białkach (10). Najgroźniejszy dla struktury DNA jest rodnik hydroksylowy, który uszkadza zasady azotowe, reszty cukrowcowe oraz wiązania fosfodiestrowe, powodując modyfikację nukleotydów oraz pęknięcia nici DNA. Uszkodzeniom podlegają przede wszystkim reszty tymidyny. Najpowszechniej występującym procesem wolnorodnikowym w komórce jest jednak łańcuchowa peroksydacja lipidów, polegająca na utlenianiu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które wchodzą w skład fosfolipidów błonowych i lipoprotein. W wyniku usunięcia wodoru z grupy metylenowej nienasyconego kwasu tłuszczowego powstaje rodnik alkilowy. Ten, reagując z tlenem, może przekształcać się w rodnik nadrtlenkowy. Obie formy rodników mogą wchodzić w reakcje z kolejnymi cząsteczkami kwasów tłuszczowych, powodując ich autooksydację. Reaktywne formy tlenu uszkadzają także aminokwasy, takie jak: cysteina, seryna, tyrozyna czy treonina, wpływając na zmianę aktywności enzymów i właściwości

¹⁾ Opracowanie przygotowano w ramach badań statutowych UWM w Olsztynie (nr tematu 11.610.003-300).

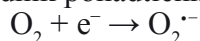
białek nieenzymatycznych. Oksydacyjnie uszkodzone białka zazwyczaj tracą aktywność biologiczną i zaczynają wykazywać tendencję do tworzenia agregatów (22). Upośledzając działanie szlaków enzymatycznych i sygnałowych, RFT indukują powstawanie nieodwracalnych zmian w komórce, w tym często jej śmierć (46). W organizmie prawie 90% reaktywnych form tlenu powstaje w łańcuchu oddechowym, jednak RFT powstają także jako rezultat autooksydacji i inaktywacji małych cząsteczek, jak na przykład zredukowane flawiny czy tiole oraz jako produkt uboczny działania enzymów, takich jak: oksydazy, cyklooksygenazy, lipooksygenazy, dehydrogenazy i peroksydazy. Do miejsc, w których powstają RFT, w komórce można zaliczyć: mitochondria, lizosomy, peroksyosomy, siateczkę śródplazmatyczną, jądro komórkowe, błonę plazmatyczną oraz cytoplazmę (22, 32).

RFT są wytwarzane zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Niewielkie ilości reaktywnych form tlenu są wykorzystywane przez komórkę m.in. do obrony przed mikroorganizmami czy pasożytami oraz podczas programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy. RFT są znanymi induktorami apoptozy w komórkach somatycznych i zarodkowych. Najważniejszym etapem procesu apoptozy jest fragmentacja DNA na nukleosomy, czyli fragmenty DNA o długości około 180-200 par zasad. Fragmentacja DNA jest katalizowana przez endonukleazy, zależne od Ca^{2+} i Mg^{2+} . Zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie powoduje aktywację enzymów nukleolitycznych. Najprawdopodobniej wzrost ilości wolnych rodników powoduje uwolnienie Ca^{2+} z mitochondriów, co inicjuje proces apoptozy. RFT mogą też regulować programowaną śmierć komórki poprzez wpływ na ekspresję dwóch głównych grup czynników zaangażowanych w apoptozę, Bcl-2 i FasL (20). W warunkach patologicznych nagromadzenie RFT skutkuje uszkodzeniami struktur wewnątrzkomórkowych. Zjawisko „stresu oksydacyjnego” definiuje się jako naruszenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT a działaniem systemu antyoksydacyjnego organizmu (13). Termin ten stosuje się zwykle wtedy, gdy poziom oksydantów przewyższa poziom antyoksydantów (46).

Komponenty systemu antyoksydacyjnego

Enzymatyczne układy antyoksydacyjne. W normie fizjologicznej RFT są stale unieczynniane przez lokalne systemy antyoksydacyjne. Podstawowymi enzymami antyoksydacyjnymi w komórkach zwierzęcych są: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) oraz peroksydaza glutationowa (GPx). Nazywane są one tzw. „triadą enzymatyczną”. Dodatkowo, z peroksydazą glutationową współdziała reduktaza glutationowa (GR) (10).

Generowanie RFT jest procesem wieloetapowym. Najpierw w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy:

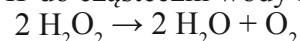


Następnie SOD przeprowadza reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru:



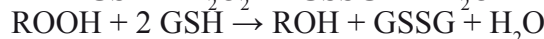
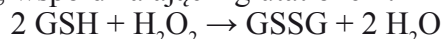
SOD jest metaloenzymem występującym wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo. Enzym wewnątrzkomórkowy zlokalizowany jest w cytoplazmie lub w macierzy mitochondrialnej. Pierwszy z nich w swym centrum aktywnym zawiera atomy miedzi i cynku (Cu,Zn-SOD; SOD-1), natomiast drugi manganu (Mn-SOD; SOD-2). Z kolei w środowisku zewnątrzkomórkowym znajduje się pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa EC-SOD (SOD-3) zawierająca miedź i cynk (18).

Powstały nadtlenek wodoru, który łatwo przenika przez błony, jest następnie rozkładany w peroksyosomach przez CAT do cząsteczki wody i tlenu.



Katalaza jest żelazoporfiryną zawierającą cztery grupy hemowe. Najwyższa aktywność enzymu występuje w wątrobie, erytrocytach oraz nerkach. Katalaza wykazuje największe powinowactwo do nadtlenu wodoru, gdy jego stężenie jest wyższe niż 10^{-6} M (10).

Z kolei GPx przeprowadza redukcję nie tylko nadtlenu wodoru, ale także nadtlenu organicznych (ROOH), współdziałając z glutationem.



GPx jest selenoenzymem, który przeprowadza reakcję redukcji nadtlenu wodoru do wody, przekształcając zredukowany glutation w jego postać utlenioną (GSSG). Enzym ten redukuje także nadtlenuki do alkoholi. Aby nie doszło do inaktywacji białek poprzez powstały GSSG, z peroksydazą współdziała reduktaza glutationowa. Reduktaza odtwarza zredukowaną postać glutationu (GSH) kosztem utleniania NADPH (18):



Niskocząsteczkowe antyoksydanty. Każda komórka dysponuje nie tylko enzymami antyoksydacyjnymi rozkładającymi wolne rodniki, ale także niskocząsteczkowymi związkami wchodzącymi w reakcje z nimi. Nazywane są one przeciwutleniaczami lub antyoksydantami. Są to: L-glutation, L-ergotioneina, kwas L-askorbowy (wit. C), α -tokoferol (wit. E), kwas moczowy, tauryna oraz hipotauryna (10). Do grupy antyoksydantów często zalicza się również wielofunkcyjne białko o masie cząsteczkowej około 60 kDa – albuminę (39). Antyoksydanty działają w dwojaki sposób. Mogą wejść w reakcję z czynnikami utleniającymi i nazywane są wtedy antyoksydantami prewencyjnymi lub też łączą się bezpośrednio z produktami pośrednimi utleniania, tj. wolnymi rodnikami i wtedy noszą nazwę antyoksydantów interwencyjnych. Antyoksydanty dzielą się na dwa rodzaje: hydrofilowe (np. L-glutation, kwas L-askorbowy czy L-ergotioneina), które chronią cytoplazmę komórki oraz hydrofobowe (np. tokoferole), które chronią strukturę błon komórkowych (10).

Antyoksydacyjne działanie L-glutationu to przede wszystkim detoksykacja nadtlenu wodoru, nadtlenu-

ków organicznych i innych reaktywnych form tlenu, a także egzo- i endogennych związków elektrofilnych oraz możliwość chelatowania jonów metali. Potencjał redoks układu GSSG/GSH pozwala także na zachodzenie reakcji między glutationem zredukowanym a utlenionymi postaciami innych antyoksydantów (12).

L-ergotioneina w dużych ilościach jest preferencyjnie odkładana w narządach, komórkach oraz płynach wydzielniczych najbardziej narażonych na wystąpienie zjawiska stresu oksydacyjnego i procesu zapalnego. Wysoką zawartość L-ergotioneiny wykazano w wątrobie, nerkach, erytrocytach, soczewkach oczu oraz plazmie nasienia. Działa ona jako potężny „zmiatacz” rodnika hydroksylowego, kwasu podchlorowego i nad-tlenoazotyenu (16).

Witamina C (kwas L-askorbowy) jest rozpuszczalna w wodzie. Może ona wchodzić w bezpośrednie reakcje z anionorodnikiem ponadtlenkowym, rodnikiem hydroksylowym oraz tlenem singletowym. Kwas L-askorbowy może także regenerować zredukowaną formę witaminy E (32).

Witamina E (α -tokoferol) – antyoksydant rozpuszczalny w tłuszczach i obecny we wszystkich błonach komórkowych – chroni przed peroksydacją lipidów. Witamina E może reagować bezpośrednio z rodnikiem nadtlenkowym, hydroksylowym oraz anionorodnikiem ponadtlenkowym. W tkankach ubogich w witaminę E wykazano wzrost zawartości aldehydów, nad-tlenków i lipofuscyn podczas ataku RFT (32).

Wykazano, że także kwas moczowy może chronić komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Podczas przekształcania kwasu moczowego w alantoinę neutralizacji podlegają rodniki hydroksylowe, wodoronadtlenki lipidów oraz cząsteczki tlenu singletowego. Działanie kwasu moczowego jako antyoksydanta przejawia się również jego udziałem w stabilizowaniu cząsteczek kwasu linolenowego i utrzymywaniu ciągłości błon komórkowych erytrocytów (19).

Tauryna (kwas 2-aminometylosulfonowy) jest wolnym aminokwasem biogennym obecnym w większości tkanek ssaków. Mimo że tauryna nie wchodzi w skład żadnych komponentów białkowych, odgrywa ważną rolę w osmoregulacji, proliferacji komórek oraz ich ochronie przed uszkodzeniami powstałymi podczas stresu oksydacyjnego. Działanie tauryny jako antyoksydanta w układach biologicznych wyraża się poprzez jej uczestnictwo w stabilizowaniu błon plazmatycznych, „zmiataniu wolnych rodników”, a także zmniejszaniu nasilenia procesu peroksydacji lipidów (17, 47). Z kolei hipotauryna neutralizuje głównie rodnik hydroksylowy, co zapobiega procesowi peroksydacji lipidów (6).

W grupie antyoksydantów albumina reprezentuje główną zaporę antyoksydacyjną osocza krwi. Wolne jony miedziowe oraz żelazawe mogą reagować z nad-tlenkiem wodoru, tworząc duże ilości wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego. Poprzez posiadanie w swojej budowie cząsteczkowej licznych

miejsz wiążących specyficzne ligandy, zwłaszcza jony miedzi i żelaza, albumina działa jako uniwersalny antyoksydant (39).

Rola RFT w fizjologii plemników

Plemniki są zdolne do produkowania niewielkich ilości RFT, niezbędnych do prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych, takich jak kapacytacja, hiperaktywacja czy fuzja z oolemą (4). Wykazano także, że niewielkie ilości RFT są niezbędne do zajścia reakcji akrosomowej i utrzymania przez plemniki ruchliwości (1). Zdolność plemników do wytwarzania wolnych rodników zależy od stopnia ich dojrzałości (44). Większość prób nasienia zawiera zróżnicowaną liczbę leukocytów, a zwłaszcza neutrofilów zaobserwowanych jako dominujący typ białych krwinek występujących w ejakulacie (3, 41). Zaktywowane neutrofile generują i uwalniają RFT w celu przeprowadzenia reakcji dezaktywujących patogeny (35). Apoptoza, indukowana m.in. przez RFT, jest jednym z mechanizmów eliminowania komórek nieprawidłowych. Badania modelowe przeprowadzone na zwierzętach potwierdzają rolę apoptozy w prawidłowym przebiegu procesu spermatogenezy. Proces ten reguluje liczbę komórek gametogenicznych w nabłonku plemnikotwórczym, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Podwyższony indeks apoptotyczny w ejakulacie stwierdzano w stanach zapalnych, nowotworach układu rozrodczego i u niepłodnych osobników. Prawdopodobnie ma to ścisły związek ze stresem oksydacyjnym. Obserwowano np. wzrost fragmentacji DNA plemników po inkubacji z układem generującym RFT. Proces ten był istotnie redukowany w obecności antyoksydantów (20).

Pierwsze doniesienie, które opisywało szkodliwy wpływ RFT na plemniki, opublikowano ponad 60 lat temu. Przyjęto, że nadmierna produkcja RFT w nasieniu, peroksydacja lipidów i oksydacja DNA są bezpośrednio powiązane z obniżoną zdolnością zapładniającą plemników i zaburzeniami płodności. RFT pośrednio modyfikują budowę błony plazmatycznej plemników poprzez zmianę ilości zawartych w niej fosfolipidów i cholesterolu (29). Wykazano, że proces peroksydacji lipidów poprzez naruszenie uporządkowania warstwy fosfolipidowej plazmoemy zmienia jej płynność (5, 7). Stres oksydacyjny wpływa zarówno na zmianę właściwości błon plazmatycznych, jak i integralność DNA plemników (2). Udowodniono, że wysoka zawartość RFT w nasieniu prowadzi do nasilonej peroksydacji lipidów błonowych, obniżonej ruchliwości i przeżywalności plemników oraz zwiększonej liczby plemników z morfologicznie zmienionymi wstawkami (13).

System antyoksydacyjny nasienia knura

Nasienie knura charakteryzuje się funkcjonowaniem specyficznego systemu antyoksydacyjnego. Spowodowane jest to budową plemników tego gatunku

oraz składem ejakulatu. Wiele parametrów mikro- i makroskopowych wyróżnia ejakulat knura spośród nasienia innych gatunków zwierząt (42). Plemniki knura charakteryzują się swoistą budową błon plazmatycznych. Występowanie w plazmolemie dużej ilości białek oraz niska wartość stosunku cholesterol/fosfolipidy powodują wysoką wrażliwość plemników na udar chładowy i osmotyczny (30). Skład lipidowy plazmolemy warunkuje ruchliwość oraz przeżywalność plemników knura. Głównymi kwasami tłuszczowymi nienasyconymi, występującymi w plazmolemie plemników knura, są kwas dokozapentaenowy (DPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) (15). Dodatkowo w błonie plazmatycznej występują kwasy tłuszczowe o 3 i 4 wiązaniach nienasyconych, między innymi kwas linolenowy i arachidonowy. Dominującym kwasem tłuszczowym jest jednak nasycony kwas dokozanowy (behenowy) zawierający 22 atomy węgla. Funkcja biologiczna omawianych kwasów jest związana z różnymi aspektami procesów reprodukcyjnych knura (42). Wysoka zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz relatywnie niska zdolność antyoksydacyjna składników plazmy nasienia warunkują podatność plemników knura na proces peroksydacji lipidów indukowany przez reaktywne formy tlenu. Pomiar nasilenia procesu peroksydacji lipidów, mierzony ilością powstałego dialdehydu malonowego (MDA), jest laboratoryjną metodą analityczną określającą integralność błony cytoplazmatycznej plemników (41). W warunkach zwiększonego wytwarzania RFT w organizmie zawartość MDA wzrasta. Powoduje to zmianę w przepuszczalności błon komórkowych, rozpręganie fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, a w konsekwencji może powodować apoptozę (18). Metabolizm plemników jest głównym źródłem reaktywnych form tlenu w plazmie nasienia, których podwyższone stężenie może powodować obniżenie ruchliwości i przeżywalności plemników oraz przepuszczalności ich plazmolemy podczas przechowywania nasienia (44).

W skład plazmy nasienia knura wchodzi wydzieliny dodatkowych gruczołów płciowych, zwłaszcza mocno rozbudowanych gruczołów pęcherzykowych. Gruczoły pęcherzykowe są głównym źródłem nie tylko L-ergotioneiny (42), lecz także L-glutationu oraz kwasu L-askorbowego (23). L-glutation wspólnie z L-ergotioneiną chronią grupy tiolowe białek plemnikowych, utrzymując je w formie zredukowanej (23). Plemniki zawieszane w plazmie nasienia są skutecznie chronione przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (11). Antyoksydanty występujące w plazmie nasienia kompensują deficyt cytoplazmatycznych enzymów antyoksydacyjnych w plemnikach (44). Z drugiej strony, plazma nasienia knura charakteryzuje się niższą zawartością niskocząsteczkowych antyoksydantów, tj. L-glutationu, kwasu L-askorbowego i L-ergotioneiny w porównaniu z plazmą nasienia innych gatunków ssaków (45). Ponieważ zawartość L-glutationu w nasieniu

knura jest bardzo niska, aktywność peroksydazy oraz reduktazy glutationowej jest również bardzo niewielka bądź niewykrywalna (31).

Inkubacja plemników knura w rozcieńczalniku z dodatkiem systemu generującego powstawanie RFT (układ ksantyna-oksydaza ksantynowa) przez 30 minut, wykazała statystycznie istotny wzrost zawartości nadtlenu wodoru w plemnikach, podczas gdy poziom anionorodnika ponadtlenkowego pozostał niezmienny. Wyniki takie wskazują, że H_2O_2 jest w głównej mierze odpowiedzialny za uszkodzenia oksydacyjne powstające w plemnikach knura (7). Mimo że nadtlenek wodoru jest stosunkowo mało reaktywny oraz elektrycznie obojętny, związek ten może łatwo dyfundować przez błony komórkowe i pojawiać się w różnych przedziałach komórki (10).

Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w nasieniu knura

W badaniach przeprowadzonych przez zespół Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie nie wykazano aktywności katalazy w nasieniu knura (26). Aktywności CAT nie wykazano także w plemnikach knura pochodzących z głowy najądrzy. Wydaje się, że głównym enzymem odpowiedzialnym za rozkład nadtlenu wodoru w plemnikach jest peroksydaza glutationowa wodoronadtlenków fosfolipidów (PHGPx). Wykazano, że aktywność omawianego enzymu w plemnikach tego gatunku jest ponad 7 razy wyższa od aktywności GPx (27). Brak lub niewielka aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych w nasieniu knura rekompensowana jest bardzo wysoką aktywnością plazmowej dysmutazy ponadtlenkowej (EC SOD) oraz właściwościami antyperoksydacyjnymi białek plazmy nasienia (25, 45). Głównym źródłem SOD plazmy są płyny ogona najądrzy oraz prostaty (26). Plazmowa forma SOD jest termostabilną glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 67 kDa. Wyznaczenie parametrów fizykochemicznych i kinetycznych enzymu pozwoliło na zakwalifikowanie go do grupy zewnątrzkomórkowych, miedziowo-cynkowych dysmutaz ponadtlenkowych (EC Cu,Zn-SOD). Enzym ten stanowi główną ochronę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i szkodliwym wpływem RFT (25). We frakcji plemnikowej ejakulatu 66% aktywności SOD jest związanych z plemnikami, natomiast reszta – z kroplami cytoplazmatycznymi niedojrzałych plemników i plazmą nasienia. Kolejne badania zespołu KBiBZ w Olsztynie wykazały występowanie trzech form SOD w plemnikach knura. Jedną z izoform enzymu, odzyskana z plemników po udarze chładowym oraz homogenizacji, charakteryzuje się masą cząsteczkową około 67 kDa. Optimum temperaturowe dla tego białka wynosiło 20-45°C, natomiast optimum pH = 10,0. Aktywność enzymu odzyskanego po udarze chładowym hamowana była przez nadtlenek wodoru (H_2O_2) w 65% i dietylotio-karbaminian (DDC) w 40%, natomiast aktywność en-

zymu izolowanego po homogenizacji plemników była hamowana przez oba inhibitory w 40%. Z kolei druga forma enzymu, odzyskana z plemników po ekstrakcji mocznikiem, o masie cząsteczkowej wynoszącej około 30 kDa miała optimum temperaturowe w zakresie 20-37°C i optimum pH = 10,0. Aktywność tego enzymu hamowana była przez H₂O₂ w 35%, DDC w 80% i 2-merkaptoetanol w 15%. Immunodyfuzja żelowa wykazała podobieństwo determinantów antygenowych enzymu plazmowego oraz form plemnikowych (37).

Wykazano, że aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (Cu/ZnSOD) w plemnikach knurów różni się pomiędzy ejakulatami o wysokiej i słabej przydatności do kriokonserwacji. W przypadku ejakulatów o niskiej kriotolerancji stwierdzano wyższą aktywność Cu/ZnSOD w plemnikach po rozmrożeniu. Zjawisko to związane było ze zróżnicowaną podatnością plazmolemy plemników u analizowanych osobników na uszkodzenia wywoływane przez udar chłodowy (14).

Najnowsze badania wskazują, że w plazmie nasienia knura występuje aktywność również innych enzymów chroniących plemniki przed skutkami stresu oksydacyjnego. Tioredoksyny (TRX) oraz peroksyredoksyny (PRDX) są białkami antyoksydacyjnymi występującymi w różnorodnych tkankach i komórkach. Tioredoksyny są wielofunkcyjnymi polipeptydami uczestniczącymi w licznych reakcjach utleniania i redukcji. W swym centrum aktywnym zawierają reszty cysteiny, które mogą ulegać odwracalnej oksydacji (34). Współdziałają one z reduktazami glutationowymi tioredoksyn, które przy udziale NADPH regenerują zredukowaną postać tioredoksyn. Z kolei wysoka aktywność izoform TRX w komórce gwarantuje utrzymanie białek z rodziny peroksyredoksyn w zredukowanej formie. W witce plemnika mężczyzny wykazano obecność dwóch tkankowo specyficznych tioredoksyn – SPTRX-1 oraz SPTRX-2 (36). Peroksyredoksyny spełniają w organizmie wiele różnorodnych funkcji, m.in. biorą udział w detoksykacji, odpowiedzi immunologicznej, przekazywaniu sygnałów w komórce, proliferacji i różnicowaniu komórek, apoptozie oraz czynnej ochronie komórek przed skutkami stresu oksydacyjnego. Enzymy te zawierają jedną lub więcej reszt cysteiny (Cys). W zależności od ilości reszt cysteiny biorących udział w katalizie enzymatycznej oraz ich położenia oznaczono je peroksyredoksynami od 1 do 6 (PRDX1-PRDX6). Do tej pory wykazano, że peroksyredoksyna 5 chroni przed zmianami powstałymi podczas działania stresu oksydacyjnego, natomiast peroksyredoksyna 6 zmniejsza nasilenie owego procesu (38). Białka z rodziny PRDX reagują z nadtlakiem wodoru poprzez resztę sulfhydrylową. Masę cząsteczkową białka określono na około 20 kDa. W zależności od rodzaju tkanki układu rozrodczego knura, enzym ten występuje w różnej liczbie izoform. Ponieważ PRDX znaleźć można także w plazmie nasienia knura, prawdopodobne jest, że część obecnej tam peroksyredoksyny jest adsorbowana i opłaszczana

na powierzchni plemnika (33). W rejonie postakrosomowym plemników knura znaleźć można również peroksyredoksynę 2 (PRDX 2) – białko neutralizujące nadtlak wodoru znacznie efektywniej niż katalaza czy peroksydaza glutationowa. Utleniona forma PRDX 2 jest z powrotem przekształcana w formę zredukowaną poprzez system tioredoksynowy (33).

Z kolei paraoksonaza-1 (PON-1) jest zewnątrzkomórkowym enzymem związanym z frakcją lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL). Posiada ona właściwości antyoksydacyjne oraz przeciwzapalne. Chroni lipoproteiny niskiej oraz wysokiej gęstości przed utlenieniem, a tym samym chroni komórki przed skutkami stresu oksydacyjnego. Wysoka aktywność enzymu w plazmie nasienia koreluje pozytywnie z jakością i funkcjonalnością nasienia knura przechowywanego w stanie płynnym (9) oraz z całkowitą zawartością cholesterolu w plazmie nasienia (8). Paraoksonaza typu II (PON-2) jest z kolei enzymem wewnątrzkomórkowym, którego aktywność wykazano w ejakulowanych plemnikach knura w regionie postakrosomowym. Jeśli aktywność PON-1 jest niska, aktywność PON-2 wzrasta na zasadzie mechanizmu kompensującego. Wysoka aktywność PON-2 zmniejsza status oksydacyjny komórki, zapobiegając jej przedwczesnej apoptozie. Z drugiej jednak strony, wysoka aktywność PON-2 wystarcza jedynie do neutralizacji RFT generowanych w nadmiernych ilościach przez same plemniki. Gdy w nasieniu pojawiają się dodatkowe, zewnętrzne źródła RFT, aktywność PON-2 jest wspomagana wysoką aktywnością PON-1 (8).

Potencjał antyoksydacyjny nasienia knura

Potencjał antyoksydacyjny nasienia zależy od wybranych czynników molekularnych, osobniczych oraz środowiskowych. Zmiany ilościowe i jakościowe składu biochemicznego plazmy nasienia wpływają na funkcjonalność akrosomu, wstawki oraz chromatyny plemników. Istotnym składnikiem plazmy nasienia knura są białka. Wykazano wysoką korelację pomiędzy zawartością białka całkowitego w plazmie nasienia a jej zdolnością antyoksydacyjną (45). Zawartość antyoksydantów w nasieniu knura podlega również kontroli hormonalnej. Prawidłowa synteza hormonów steroidowych oraz ich relacje ilościowe wpływają na zabezpieczenie prawidłowych funkcji reprodukcyjnych knura. Synteza hormonów steroidowych w obrębie układu rozrodczego knura stymulowana jest przez hormon luteinizujący (LH), a ich stężenia są ze sobą wzajemnie skorelowane (40). Sprawność antyoksydacyjna nasienia tego gatunku zależy także od pory roku (43). Najwyższą aktywność antyoksydacyjną obserwuje się jesienią i wiosną (28). Na zabezpieczenie funkcji antyoksydacyjnych nasienia wpływa również żywienie knura. Pasze komercyjne, podawane knurom, zawierają duże ilości mączek sojowych oraz śrut rzepakowych. Omawiane komponenty paszowe mogą naruszać stosunek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych,

zwłaszcza kwasu DHA (C_{22:6}), obecnych w nasieniu. Może to wpływać na zakłócenie statusu plazmolemy plemników. Podawanie w diecie knurom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, pochodzących z oleju z tuńczyka, po upływie 5-6 tygodni statystycznie istotnie zwiększało zawartość kwasów 22:6 (n-3) oraz zmniejszało zawartość kwasów 22:5 (n-6) w odniesieniu do wszystkich kwasów tłuszczowych plemników. Zmianie tej towarzyszył wzrost ruchliwości plemników, wzrost odsetka plemników z prawidłowym akrosomem oraz spadek odsetka plemników wykazujących zmiany morfologiczne (40). Z kolei wprowadzenie do diety knurów dodatku PROSPERM® (pszenica, olej rybny i mączka sojowa) zwiększało zawartość kwasu L-askorbowego i L-ergotioneiny w plazmie nasienia oraz jej zdolność antyperoksydacyjną. Dodatek ten nie wpływał jednak statystycznie istotnie na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w plazmie nasienia oraz produkcję dialdehydu malonowego (MDA) podczas indukowanej peroksydacji lipidów (44).

Substancje osłaniające plemniki zastosowane w przechowywaniu nasienia knura, takie jak żółtko jaja kurzego, skutecznie ograniczają formowanie się nadmiernych ilości reaktywnych form tlenu (21). Wskaźniki jakości ejakulatu knura ulegały znaczącej poprawie po suplementacji rozcieńczalników do przechowywania nasienia wybranymi antyoksydantami. Dodatek witaminy E powodował wzrost ruchliwości i przeżywalności plemników po przeprowadzeniu procesu kriokonserwacji. Z kolei dodatek L-glutationu do rozcieńczalnika podczas przechowywania nasienia knura w stanie płynnym powodował wzrost ruchliwości plemników (24).

W plemnikach żywotnych pochodzących z nasienia świeżego, przechowywanego w stanie płynnym oraz poddanego kriokonserwacji poziom RFT oraz nasilenie procesu peroksydacji lipidów są zwykle umiarkowane. Można to przypisać albo ogromnej wydajności całego wewnętrznego systemu antyoksydacyjnego, albo wystarczającej ochronie enzymatycznej nasienia zdolnej do neutralizowania anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenu wodoru (21).

Występowanie dużych ilości reaktywnych form tlenu (RFT) w ejakulacie knura może wynikać ze słabej jakości nasienia. Brak równowagi pomiędzy pro- i antyoksydantami w nasieniu prowadzi do zaburzeń metabolicznych i czynnościowych na poziomie plemników. Za występowania stresu oksydacyjnego w nasieniu może odpowiadać stan zapalny w obrębie męskiego układu rozrodczego. Prowadzi to do infiltracji leukocytów do miejsca toczącej się reakcji zapalnej. Z kolei aktywacja leukocytów wiąże się z wytworzeniem i uwolnieniem dużych ilości RFT oraz uruchomieniem odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko czynnikom infekcyjnym. Stres oksydacyjny może być też skutkiem poddania nasienia knura obróbce technologicznej. Proces ten, poprzez indukowanie powstawania RFT, upośledza zdolność zapładniającą

i fizjologię plemników. W wyniku długofalowego działania stresu oksydacyjnego w nasieniu knura dochodzi do zmniejszenia liczby, spadku ruchliwości oraz powstawania nieprawidłowych morfologicznie plemników, dlatego badanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia oraz poziomu RFT w nasieniu znajduje zastosowanie w określaniu przydatności ejakulatu knura do procedur technologicznych.

Piśmiennictwo

1. Agarwal A., Nallella K. P., Allamaneni S. S., Said T. M.: Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online* 2004, 8, 616-627.
2. Agarwal A., Saleh R., Bedaiwy M. D.: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 2003, 79, 829-843.
3. Aitken R. J.: Free radicals, lipid peroxidation, sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995, 7, 659-668.
4. Aitken R. J., Baker M. A., Sawyer D.: Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reprod. Biomed. Online* 2003, 7, 65-70.
5. Aitken R. J., Buckingham D. E., Harkiss D.: Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 1993, 35, 302-315.
6. Alvarez J. G., Storey B. T.: Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 1983, 29, 548-555.
7. Awda B. J., Mackenzie-Bell M., Buhr M. M.: Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol. Reprod.* 2009, 81, 553-561.
8. Barranco I., Roca J., Tvarijonavičiute A., Rubér M., Vicente-Carrillo A., Atikuzzaman M., Ceron J. J., Martinez E. A., Rodriguez-Martinez H.: Measurement of activity and concentration of paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates. *Mol. Reprod. Dev.* 2015, 82, 58-65.
9. Barranco I., Tvarijonavičiute A., Perez-Patiño C., Alkmin D. V., Ceron J. J., Martinez E. A., Rodriguez-Martinez H., Roca J.: The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility. *Andrology* 2015, 1-6.
10. Bartosz G.: *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo PWN, Warszawa 2004.
11. Baumber J., Sabeur K., Vo A., Ball B. A.: Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2003, 60, 1239-1247.
12. Biłska A., Kryczyk A., Włodek L.: Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postępy Hig. Med. Dosw.* 2007, 61, 438-453.
13. Budai C., Egerszegi I., Olah J., Javor A., Kovacs A.: The protective effect of antioxidants on liquid and frozen stored ram semen – review. *Anim. Sci. Biotech.* 2014, 47, 46-52.
14. Casas I., Sancho S., Briz M., Pinart E., Bussalleu E., Yeste M., Bonet S.: Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 2010, 118, 69-76.
15. Cerolini S., Maldijan A., Surai P., Noble R.: Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 58, 99-111.
16. Cheah I. K., Halliwell B.: Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1822, 784-793.
17. Chesney R. W.: Taurine: its biological role and clinical implications. *Adv. Pediatr.* 1985, 32, 1-42.
18. Czajka A.: *Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu*. Now. Lek. 2006, 75, 582-586.
19. Davies K. J. A., Sevanian A., Muakkassah-Kelly S. F., Hochstein P.: Uric acid-iron ion complexes. *Biochem. J.* 1986, 235, 747-754.
20. Frączek M., Kurpisz M.: System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2005, 59, 523-534.
21. Guthrie H. D., Welch G. R.: Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 2012, 78, 1700-1708.
22. Gutowicz M.: Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy. *Post. Hig. Med. Dosw.* 2011, 65, 104-113.
23. Jelezarsky L., Vaisberg Ch., Chaushev T., Sapundijev E.: Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology* 2008, 69, 139-145.
24. Kaeoket K., Tantiparinayakul K., Kladkaew W., Chanapiwat P., Techakumphu M.: Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Thai J. Agric. Sci.* 2008, 41, 1-9.

25. Kowalówka M., Wysocki P., Fraser L., Strzeżek J.: Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reprod. Domest. Anim.* 2008, 43, 490-496.
26. Koziorowska-Gilun M., Kowalówka M., Koziorowski M., Strzeżek J.: Antyoksydacyjny status płynów sekrecyjnych ogona najądrzy oraz płynów dodatkowych gruczołów płciowych knura. *Acta Biochim. Pol.* 2006, 53, 129-130.
27. Koziorowska-Gilun M., Koziorowski M., Fraser L., Strzeżek J.: Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reprod. Domest. Anim.* 2011, 46, 527-533.
28. Kuklińska M.: Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) w nasieniu knura – oczyszczenie i właściwości. Rozprawa doktorska, UWM, Olsztyn 2005.
29. Lamirande de E., Jiang H., Zini A., Kodama H., Gagnon C.: Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 1997, 2, 48-54.
30. Leeuw de F. E., Colenbrander B., Verkleij A. J.: The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim.* 1991, 1, 95-104.
31. Li T K.: The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 1975, 12, 641-646.
32. Machlin L J, Bendich A.: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb J.* 1987, 1, 441-445.
33. Manandhar G., Miranda-Vizuete A., Pedrajas J. R., Krause W. J., Zimmerman S., Sutovsky M., Sutovsky P.: Peroxiredoxin 2 and peroxidase enzymatic activity of mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2009, 80, 1168-1177.
34. Miranda-Vizuete A., Tsang K., Yu Y., Jimenez A., Pelto-Huikko M., Flickinger C. J., Sutovsky P., Oko R.: Cloning and developmental analysis of murid spermatid-specific thioredoxin-2 (SPTRX-2), a novel sperm fibrous sheath protein and autoantigen. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 44874-44885.
35. Ochsendorf F. R.: Infections in male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update* 1999, 5, 399-420.
36. O'Flaherty C.: The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Adv. Androl.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/626374>
37. Orzolek A., Wysocki P., Strzeżek J., Kordan W.: Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16°C) in different extenders. *Reprod. Biol.* 2013, 13, 34-40.
38. Rhee S. G., Chae H. Z., Kim K.: Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2005, 38, 1543-1552.
39. Roche M., Rondeau P., Singh N. R., Tarnus E., Bourdon E.: The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008, 582, 1783-1787.
40. Rooke J. A., Shao C. C., Speake B. K.: Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 2001, 121, 315-322.
41. Saleh R. A., Agarwal A.: Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* 2002, 23, 737-752.
42. Strzeżek J.: Biologiczne uwarunkowania wartości rozplodowej samca, [w:] Strzeżek J. (red.): *Biologia rozrodu zwierząt*. Wydawnictwo UWM, Olsztyn 2007.
43. Strzeżek J., Fraser L., Demianowicz W., Kordan W., Wysocki P., Holody D.: Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. *Theriogenology* 2000, 54, 949-963.
44. Strzeżek J., Fraser L., Kuklińska M., Dziekońska A., Lecewicz M.: Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids with antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod. Biol.* 2004, 4, 271-287.
45. Strzeżek J., Łapkiewicz S., Lecewicz M.: A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 1999, 17, 181-188.
46. Tvrdá E., Kňážícká Z., Bárdos L., Massányi P., Lukáč N.: Impact of oxidative stress on male fertility – a review. *Acta Vet. Hung.* 2011, 59, 465-484.
47. Wright C. E., Tallan H. H., Lin Y. Y., Gaull G. E.: Taurine: biological update. *Annu. Rev. Biochem.* 1986, 55, 427-453.

Adres autora: dr inż. Aleksandra Orzolek, ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn; e-mail: deszczka@gmail.com