

Całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAS) jako wskaźnik oceny wartości nasienia ogiera

Zenon Podstawski, Kazimierz Kosiniak-Kamysz, Anna Bittmar,
Monika Stefaniuk-Szmukier

Uniwersytet Rolniczy, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Instytut Nauk o Zwierzętach,
Zakład Hodowli Koni, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Wstęp

Główną przyczyną generowania Reaktywnych Form Tlenu (RFT) w nasieniu jest wysoka koncentracja nienasyconych kwasów tłuszczowych w strukturze błon plazmatycznych oraz ograniczone możliwości lokalizacji pełnego enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego plemnika, spowodowane niską zawartością cytoplazmy we wstawce plemnika. Nadmiar ich może prowadzić do zachwiania równowagi między wytwarzaniem a niszczeniem wolnych rodników i w ostateczności do powstania stresu oksydacyjnego (Strzeżek, 1999; Luberdą i Strzeżek, 1990; Jedlińska-Krakowska, 2005). Zachowanie równowagi między wytwarzaniem a neutralizacją wolnych rodników jest bardzo istotne, dlatego w plazmie nasienia – obok triady enzymatycznej – są różne składniki nisko i wysokocząsteczkowe, które mają właściwości antyoksydacyjne. Należą do nich między innymi: zredukowany glutation, ergotioneina, kwas L-askorbinowy, tokoferol, kwas moczowy, białka plazmowe i białkowe substancje immunomodulacyjne, a także substancje antybakteryjne, np. lizozym czy glikozydazy (Strzeżek, 1999). Stres oksydacyjny działa destrukcyjnie na prawidłową funkcję plemników i prowadzi do poważnych zmian w ich strukturze, a nawet do ich śmierci.

Wzrost nieswoistej przepuszczalności błon plazmatycznych plemników w wyniku modyfikacji ich struktur lipidowych jest odpowiedzialny za obniżenie ruchliwości i przeżywalności plemników. Oksydacyjne zmiany w struktu-

rze i topografii białek błonowych główki i witki mogą zaburzać proces kapacytacji, reakcję akrosomalną i ostatecznie fuzję oocyt-plemnik (Frączek i Kurpisz, 2005).

Za uszkodzenia DNA odpowiedzialny jest rodnik hydroksylový, doprowadzając do powstania pojedynczych lub podwójnych pęknięć nici DNA, co powoduje nasilenie się procesów apoptozy, a w konsekwencji zaburzenia w rozrodzie.

Całkowitą aktywność antyoksydacyjną całego organizmu, jak i samej plazmy nasienia można określić za pomocą testu TAS (Total Antioxydant Status). Test taki, jak piszą Kleczkowski i in. (1998), może być również przydatny przy ocenie wartości nasienia samców. Wcześniejsze badania prowadzone nad określeniem całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w osoczu nasienia ogiera przez Kosiniaka-Kamysza i in. (2004), a także knura przez Kuklińską i in. (2005) wskazały na możliwość wykorzystania pomiaru TAS w ocenie wartości nasienia tych samców.

W celu uzyskania odpowiedzi czy TAS może być wskaźnikiem w ocenie jakości nasienia ogiera podjęto badania nad określeniem wartości całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w nasieniu ogierów w odniesieniu do wybranych parametrów podstawowej oceny jego jakości.

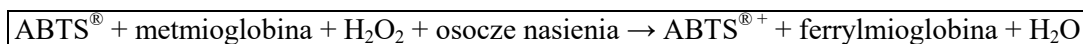
Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło nasienie pozyskane od 184 ogierów w wieku 6–31 lat,

należących do 5 ras (śląskiej, polski koń zimno-krwisty, polski koń szlachetny półkrwi, wielkopolskiej, małopolskiej). Nasienie pobierano przy użyciu sztucznej pochwy typu otwartego. Każdy ejakulat bezpośrednio po pobraniu poddawano rutynowej ocenie makro i mikroskopowej, ustalając objętość oraz ruchliwość plemników z uwzględnieniem ruchu postępowego. Ejakulatory podzielono na dwie grupy ze względu na ocenę ruchliwości i koncentrację plemników (kwalifikując do grupy I ejakulatory o ruchliwości $\geq 30/70$ i koncentracji plemników w 1 cm^3 nasienia $\geq 0,2 \times 10^9$ pl, natomiast wszystkie pozostałe ejakulatory

o niższych wartościach tych wskaźników do grupy II). Koncentrację plemników oznaczano na fotometrze Specol przy długości fali 550 nm w 100-krotnie rozrzedzonym nasieniu 2,9% roztworem cytrynianu sodu, podając liczbę plemników w cm^3 nasienia $\times 10^9$.

Oznaczeń TAS w osoczu nasienia ogiera dokonano przy zastosowaniu zestawu odczynnikowego firmy Randox Laboratories Ltd. metodą opartą na inkubacji ABTS[®] (2,2'-Azyno-di-[sulfonian 3-etylbentiazoliny]) z peroksydazą (metmioglobina) i H₂O₂ w celu otrzymania kationowej formy ABTS^{®+}.



Poziom antyoksydantów w osoczu nasienia określano na podstawie intensywności niebiesko-zielonego zabarwienia kationowej formy ABTS, mierzonego przy fali o długości 600 nm. Całkowitą zdolność antyoksydacyjną TAS podano w molach w przeliczeniu na cm^3 nasienia (M/cm^3).

Wyniki poddano analizie statystycznej, stosując jednoczynnikową analizę wariancji dla powtarzających się pomiarów (Repeated Measures Anova), a istotność różnic między średnimi weryfikowano testem t-Studenta przy użyciu programu SigmaStat 2.03 firmy Systat Software GmbH (Erkrath, Niemcy). Do badania współczynników korelacji pomiędzy zdolnością antyoksydacyjną TAS a wskaźnikami oceny wartości nasienia użyto testu Z, a obliczenia wykonano w programie Statistica 6.0 firmy StatSoft, Inc. (USA).

Wyniki i ich omówienie

Szczegółowa analiza zawartości TAS w osoczu nasienia 184 ogierów wykazała, że średni poziom wynosił 2,1 (M/cm^3) z wahaniami od 0,05 do 4,6 (M/cm^3). Analizowane współczynniki korelacji wskazały, że statystycznie istotna zależność ($P \leq 0,05$) zachodzi tylko między TAS a koncentracją plemników ($r=0,2$). Pomiar TAS (M/cm^3) przeprowadzony w ejakulatach podzielonych na dwie grupy wykazał, że średnia jego wartość w grupie I wynosiła $2,1 \pm 1,1$, a w grupie II – $1,9 \pm 1,1$ (tab. 1).

Zbliżone średnie wartości TAS (M/cm^3) w nasieniu ogierów o odmiennych podstawowych parametrach oceny nasienia są podobne do wartości TAS zanotowanych przez Fingerową i in. (2007) w nasieniu 24 zdrowych płodnych mężczyzn na poziomie 2,48 mmol/l oraz 2,11 mmol/l w nasieniu 14 mężczyzn z problemami płodności. Na trudności w interpretacji wyników pozwalających na ustalenie zakresu całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w nasieniu zdrowych, płodnych mężczyzn zwrócili również uwagę Koca i in. (2003) oraz Garrido i in. (2004).

Z uwagi na fakt, iż TAS w przeliczeniu na jednostkę objętości (M/cm^3) w dwóch analizowanych grupach ogierów nie wykazała statystycznie istotnych różnic, pomimo istotnych różnic w wartościach wskaźników podstawowej oceny nasienia, dokonano wyliczenia TAS w przeliczeniu na koncentrację plemników o ruchu postępowym TAS ($\text{M}/10^9$ rp) zakładając, że reakcje antyoksydacyjne zachodzą w mitochondriach plemników żywych i ruchliwych. Analiza zawartości TAS w przeliczeniu na koncentrację plemników o ruchu postępowym ($\text{M}/10^9$ rp) przeprowadzona była w 162 ejakulatach spośród 184 badanych, gdyż w 22 odsetek plemników o ruchu postępowym wynosił zero. Stwierdzono, że TAS wyrażony w takiej jednostce ($\text{M}/10^9$ rp) koreluje istotnie ($P \leq 0,01$) ujemnie z ruchem ogólnym ($r = -0,39$), z ruchem postępowym ($r = -0,52$) oraz z całkowitą koncentracją plemników ($r = -0,34$) i koncentracją plemników o ruchu postępowym ($r = -0,40$). Analiza TAS

w przeliczeniu na koncentrację plemników o ruchu postępowym ($M/10^9$ rp) wykazała, że w 100 ejakulatach grupy I wartości te wahały się od

0,13 do 30,1 przy średniej 8,0 ($M/10^9$ rp), natomiast w 62 ejakulatach grupy II w zakresie od 4,0–301,7 przy średniej 74,0 ($M/10^9$ rp).

Tabela 1. Wskaźniki oceny jakości nasienia w dwóch grupach ejakulatów
Table 1. Semen quality indicators in two groups of ejaculates

| Cecha – Trait | | Grupa – Group | |
|---|--------------------------------|---------------|--------|
| | | I | II |
| | | n = 99 | n = 85 |
| Objętość ejakulatu Volume of ejaculate (cm^3) | \bar{x} | 31,7 | 33,9 |
| | SD | 16,8 | 14,1 |
| Ruch plemników Sperm motility | ogólny – total (%) | \bar{x} | 80,3** |
| | | SD | 6,8 |
| | postępowy – progressive (%) | \bar{x} | 50,6** |
| | | SD | 13,5 |
| Całkowita koncentracja plemników Total sperm concentration ($cm^3 \times 10^9$) | \bar{x} | 0,7* | |
| | SD | 0,5 | |
| Koncentracja plemników o ruchu postępowym Progressively sperm motility concentration ($cm^3 \times 10^9$ rp) | \bar{x} | 0,4** | |
| | SD | 0,3 | |
| TAS Total Antioxydants Status (M/cm^3) | \bar{x} | 2,1 | |
| | SD | 1,1 | |

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Analiza wartości TAS ($M/10^9$ rp) w określonych przedziałach w I i II grupie ejakulatów wykazała, że wraz ze wzrostem zawartości TAS obniżała się całkowita koncentracja plemników oraz koncentracja plemników o ruchu postępowym, przy czym w I grupie ejakulatów przy średnim TAS – 0,95 ($M/10^9$ rp) średnia całkowita koncentracja plemników wynosiła 1,09 przy $0,62 \times 10^9$ plemników o ruchu postępowym. Natomiast, jeśli zawartość TAS wynosiła 12,11 ($M/10^9$ rp), to całkowita koncentracja plemników wynosiła $0,54 \times 10^9$ pl., a koncentracja plemników o ruchu postę-

powym $0,25 \times 10^9$ pl. W II grupie ejakulatów przy średnim TAS 11,76 ($M/10^9$ rp) całkowita koncentracja plemników wynosiła 0,92, a koncentracja plemników o ruchu postępowym $0,10 \times 10^9$ pl. Natomiast, przy średnim TAS 191,31 ($M/10^9$ rp) koncentracja całkowita wynosiła 0,12 przy $0,01 \times 10^9$ plemników poruszających się ruchem postępowym.

Ponadto stwierdzono, że pomiędzy TAS wyrażonym w $M/10^9$ rp a TAS w M/cm^3 występuje korelacja dodatnia przy współczynniku $r = 0,62$ dla grupy I oraz $r = 0,27$ dla grupy II (tab. 2).

Tabela 2. Wartości koncentracji plemników w poszczególnych przedziałach TAS
 Table 2. Relationship between TAS and sperm concentration

| TAS Total Antioxidants Status (M/10 ⁹ rp) | | | | TAS Total Antioxidants Status (M/cm ³) | | Koncentracja plemników Sperm concentration (x 10 ⁹ / cm ³) | | | |
|--|--------------------|---------------|-------|--|------|---|------|--|------|
| | | | | | | całkowita total | | o ruchu postępowym progresie motility | |
| n | przedział range | \bar{x} | SD | \bar{x} | SD | \bar{x} | SD | \bar{x} | SD |
| Grupa I – Group I | | | | | | | | | |
| 12 | 0,1–2,0 | 0,95 | 0,50 | 0,55 | 0,43 | 1,09 | 0,65 | 0,62 | 0,40 |
| 18 | >2,0–4,0 | 2,89 | 0,56 | 1,54 | 0,83 | 1,06 | 0,64 | 0,56 | 0,34 |
| 11 | >4,0–6,0 | 4,85 | 0,56 | 1,82 | 0,96 | 0,74 | 0,41 | 0,39 | 0,23 |
| 20 | >6,0–9,0 | 7,40 | 0,77 | 2,38 | 0,95 | 0,65 | 0,27 | 0,32 | 0,12 |
| 33 | >9,0–17 | 12,11 | 2,62 | 2,91 | 0,81 | 0,54 | 0,20 | 0,25 | 0,08 |
| 5 | >17 | 25,12 | 5,20 | 3,06 | 0,19 | 0,43 | 0,12 | 0,13 | 0,04 |
| Grupa II – Group II | | | | | | | | | |
| 10 | <17 | 11,76 | 3,82 | 1,10 | 0,81 | 0,92 | 0,80 | 0,10 | 0,07 |
| 25 | >17–50 | 28,06 | 9,02 | 1,99 | 1,07 | 0,66 | 0,62 | 0,08 | 0,06 |
| 12 | >50–100 | 74,88 | 12,19 | 2,67 | 0,79 | 0,29 | 0,17 | 0,04 | 0,01 |
| 15 | >100 | 191,31 | 59,19 | 2,21 | 1,03 | 0,12 | 0,08 | 0,01 | 0,01 |

Analiza zdolności antyoksydacyjnej TAS w ejakulatach grupy I wykazała, że w 95 spośród 100 ejakulatów zawartość TAS nie przekraczała 17 (M/10⁹ rp), natomiast w 52 spośród 62 ejakulatów grupy II była wyższa od tej wartości, co wskazuje, że tylko w 15 ejakulatach, czyli 9,3% wśród 162 analizowanych wartości TAS były niezgodne z przyjętym systemem selekcji ejakulatów. Z przeprowadzonej analizy

danych wynika, że TAS w przeliczeniu na koncentrację plemników o ruchu postępowym (M/10⁹ rp) może być wiarygodnym wskaźnikiem diagnostycznym w ocenie wartości nasienia ogiera.

W oparciu o bardzo podobne pomiary zdolności antyoksydacyjnej TAS podane w M/cm³ w osoczu nasienia ogiera oraz w mmol/l u mężczyzny można sądzić, że TAS może być dobrym wskaźnikiem w ocenie wartości nasienia samców,

ale po przeliczeniu na koncentrację plemników o ruchu postępowym ($M/10^9$ rp) a nie na jednostkę objętości nasienia.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wskazują, że TAS może być wiarygodnym wskaźnikiem diagnostycznym w ocenie wartości nasienia ogiera,

ale tylko w przeliczeniu na koncentrację plemników o ruchu postępowym ($M/10^9$ rp) a nie na jednostkę objętości TAS (M/cm^3).

Wcześniejsze badania określające wartość TAS w przeliczeniu na jednostkę objętości TAS (M/cm^3) nie wykazywały różnic pomiędzy ejakulatami o zróżnicowanych wskaźnikach podstawowej oceny nasienia, dlatego można było uważać, że TAS nie może być wskaźnikiem oceny jego wartości.

Literatura

- Fingerova H., Novotny J., Barborik J., Brezinova J., Svobodova M., Krskova M., Oborna I. (2007). Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS Randox(R). Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Rep., 151 (1): 37–40.
- Frączek M., Kurpisz M. (2005). System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. Post. Hig. Med. Dośw., 59: 523–534.
- Garrido N., Meseguer M., Simon C., Pellicer A., Remohi J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. Asian J. Androl., 6 (1): 59–65.
- Jedlińska-Krakowska M. (2005). Stres oksydacyjny oraz wpływ reaktywnych form tlenowych na funkcję nasienia. Med. Weter., 61 (10): 1122–1123.
- Kleczkowski M., Kluciński W., Sitarska E., Sikora J. (1998). Stres oksydacyjny i wybrane wskaźniki stanu antyoksydacyjnego zwierząt. Med. Weter., 54 (3): 166–171.
- Koca Y., Ozdal OL., Celik M., Unal S., Balaban N. (2003). Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. Arch. Androl., 49 (5): 355–359.
- Kosiniak-Kamysz K., Gorazd M., Bittmar A., Podstawski Z. (2004). Relationship between antioxidants level, semen quality and biochemical components in stallion semen. Nukowij Wisnik, Lwów, 6, 2 (2): 173–176.
- Kuklińska M., Gorazd M., Nowacka A., Kosiniak-Kamysz K., Strzeżek J. (2005). Antioxidant system of boar and stallion seminal plasma – comparative studies. The 4th Symposium of the Society for Biology of Reproduction and Polish-Japanese Seminar, Kraków, Book of Abstract, 143.
- Luberda Z., Strzeżek J. (1990). Wybrane aspekty peroksydacji lipidów w nasieniu. Post. Nauk Rol., 4/5/6: 95–106.
- Strzeżek J. (1999). Plazma nasienia a niektóre funkcje biologiczne plemników. Post. Biol. Kom., 26, Suppl., 12: 59–68.

TOTAL ANTIOXIDANT STATUS (TAS) AS A MEASURE OF STALLION SEMEN VALUE

Summary

Determination of the total antioxidant capacity in the semen of stallions in conjunction with the analysis of this value for selected parameters of the basic assessment of semen quality was aimed to answer whether TAS can be an indicator in assessing the value of stallion semen.

Semen samples collected from 184 stallions of five breeds, aged between 6 and 31 years, were analyzed. The results showed almost identical average values of TAS per unit volume (F/cm^3) in the ejaculates of two groups (Group I – 2.1 [F/cm^3] and II – 1.9 [F/cm^3]), having radically different individual components of the primary sperm assessment, especially in the concentration of sperm progressive movement, which averaged 0.4×10^9 pm in group I and only 0.04×10^9 pm in group II. These results indicate that TAS per unit volume may not be a good indicator of the value of stallion semen. Assuming that the antioxidant reactions occur in the mitochondria of living and motile sperms, the TAS calculation was made based on concentration of progressively motile sperm TAS ($M/10^9$ pm). The mean value of TAS in group I was 8.0 ($M/10^9$ pm) while in group II it was 74.0 ($M/10^9$ pm). The obtained results indicate that TAS may be a reliable diagnostic indicator in assessing the value of stallion semen only when calculated on concentration of progressively motile sperm ($M/10^9$ pm) but not per unit volume (M/cm^3).

Key words: stallion, semen, TAS