

## Wpływ stresu oksydacyjnego na funkcje oraz jakość nasienia buhajów hodowlanych

Piotr Majchrowski<sup>1</sup>, Dominika Furman-Toczek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Małopolskie Centrum Biotechniki Sp. z o.o. w Krasem, 36-007 Krasne

<sup>2</sup>Wyższa Szkoła Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie, ul. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Proces zapłodnienia komórki jajowej jest w głównej mierze zależny od aktywności metabolicznej i ruchowej komórek plemnikowych. Prawidłowe funkcje nasienia są więc gwarantem transportu materiału genetycznego przeniesionego przez plemniki (Gogol, 2012). Przed przystąpieniem do programu hodowlanego buhaje są poddawane skrupulatnej ocenie zdrowotnej, ze szczególnym uwzględnieniem prawidłowości rozwoju narządów rozrodczych, poziomu libido, a także zdolności do krycia. Nasienie jest analizowane pod względem koncentracji plemników w całej objętości ejakulatu, ruchliwości, żywotności, morfologii, a także oporności na procesy mrożenia i rozmrażania. Pomimo tego, że krioprezerwowane nasienie spełnia restrykcyjne normy jakościowe, to różnica pomiędzy zapłodnialnością nasienia o najlepszej i najgorszej jakości wynosi około 20–25% (Larson i Miller, 2000). Tak więc, identyfikacja czynników, które mają wpływ na jakość nasienia zdaje się mieć istotne znaczenie ekonomiczne w odniesieniu do produkcji bydła użytkowego. Wykazano, że niska jakość nasienia, a także płodność danego osobnika mogą być powiązane z oddziaływaniem wielu czynników środowiskowych, fizjologicznych i genetycznych (Mathevon i in., 1998; Ghasemi i Ghorbani, 2014). Wśród wielu rozważanych czynników regulujących funkcje nasienia wskazuje się również na udział stresu oksydacyjnego oraz powiązanych z nim reaktywnych form tlenu (RFT). Podczas wykonywania technik wspomaganego rozrodu plemniki są narażone na produkcję i powstanie ponadfizjologicznego poziomu RFT. Uszkodzenia komórek na skutek aktywności RFT w wyniku mrożenia i rozmrażania próbek nasienia

są rozpatrywane jako jedne z przyczyn obniżenia zdolności zapładniającej (Watson, 2000). Celem niniejszej pracy jest zebranie informacji i omówienie możliwych mechanizmów oddziaływania reaktywnych form tlenu (RFT) na funkcje i jakość plemników.

### Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny definiuje się jako zachwianie równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu a ochronnym działaniem systemów biologicznych odpowiedzialnych za ich neutralizowanie i usuwanie. Stres oksydacyjny powiązany jest ze stanem, w którym występuje zwiększony wskaźnik uszkodzeń komórek i tkanek, powodowanych przez tlen i jego pochodne (Zabłocka i Janusz, 2008). Czynnikiem wywołującym stres oksydacyjny są reaktywne formy tlenu, a głównym źródłem ich powstania w komórkach eukariotycznych są mitochondria. W prawidłowych warunkach fizjologicznych około 95% przyswajalnego z atmosfery tlenu jest zredukowane podczas mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Do powstania RFT prowadzi metabolizm pozostałych 5% tego pierwiastka (Czajka, 2006).

### Reaktywne Formy Tlenu

Wszystkie produkty redukcji oraz wzbudzenia tlenu, charakteryzujące się większą reaktywnością niż cząsteczka tlenu będąca w podstawowym stanie trypletowym, są nazywane reaktywnymi formami tlenu (RFT) (tab. 1) (Puzanowska-Tarasiewicz i in., 2008). Głównym przedstawicielem RFT w komórkach eukariotycznych jest anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ). Jest on produktem jednoelek-

tronowej redukcji tlenu, czyli przyłączenia wolnego elektronu ( $\bar{e}$ ) do cząsteczki tlenu w formie podstawowej.  $O_2^{\cdot-}$  to wolny rodnik, tj. cząsteczka zdolna do samodzielnego istnienia, mająca jeden lub kilka niesparowanych elektronów. W swojej strukturze  $O_2^{\cdot-}$  posiada jeden niesparowany elektron oraz anion (ładunek ujemny), który jest wynikiem posiadania dodatkowego elektronu (Czajka, 2006; Kalisz i in., 2007). Przyłączenie do  $O_2^{\cdot-}$  następnego elektronu powoduje powstanie nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ), prekursora wolnych rodników. Nadtlenek wodoru może również być generowany w wyniku dwuelektronowej redukcji cząsteczki tlenu (Puzanowska-Tarasiewicz i in., 2008).  $H_2O_2$  nie jest wolnym rodnikiem, niemniej jednak wykazuje znacznie wyższą reaktywność niż tlen cząsteczkowy ( $O_2$ ) (Bartosz, 2003; Kalisz i in., 2007). Anionorodnik ponadtlenkowy w roztworach wodnych może również przyłączyć proton, wynikiem czego będzie wytworzenie rodnika wodoronadtlenkowego (Kalisz i in., 2007). Dołączenie trzech elektronów do cząsteczki tlenu

skutkuje wytworzeniem rodnika hydroksylogowego ( $\cdot OH$ ). Reakcja ta zachodzi niezbyt łatwo, jednak prowadzi do wytworzenia jednego z najbardziej reaktywnych i toksycznych utleniaczy.  $\cdot OH$  powstaje także w reakcji Fentona i Habera-Weissa, wymagającej obecności jonów metali przejściowych ( $Fe^{+2}$  lub  $Cu^{2+}$ ) (Puzanowska-Tarasiewicz i in., 2008; Zabłocka i Janusz, 2008).

Kolejną cząsteczką zaliczaną do reaktywnych form tlenu jest tlen singletowy ( $^1O_2$ ). Powstaje on na skutek wzbudzenia trypletowej cząsteczki tlenu w wyniku dostarczenia energii, wystarczającej na przegrupowanie elektronów w cząsteczce. Takie wzbudzenie cząsteczki może nastąpić wskutek zaabsorbowania promieniowania nadfioletowego lub też niektórych reakcji chemicznych. Podobnie jak nadtlenek wodoru, tlen singletowy, nie będąc wolnym rodnikiem (posiada dwa sparowane elektrony na jednym orbitalu), wykazuje dużą aktywność chemiczną (Kalisz i in., 2007; Puzanowska-Tarasiewicz i in., 2008).

Tabela 1. Reaktywne formy tlenu i reakcje ich powstawania (na podstawie: Puzanowska-Tarasiewicz i in., 2008)  
Table 1. Reactive oxygen species and reaction of their formation (based on Puzanowska-Tarasiewicz et al., 2008)

Reaktywne formy tlenu <i>Reactive oxygen species</i>	Reakcje formowania <i>Reactions of formation</i>
$O_2^{\cdot-}$ anionorodnik ponadtlenkowy <i>superoxide radical anion</i>	$O_2 + \bar{e} \rightarrow O_2^{\cdot-}$
$\cdot OH$ rodnik hydroksylogowy <i>hydroxyl radical</i>	$O_2 + 3H^+ + 3\bar{e} \rightarrow H_2O + \cdot OH$ <i>Reakcja Fentona – Fenton's reaction</i> $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ $Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + \cdot OH + OH^-$ <i>Reakcja Habera-Weissa – Haber-Weiss reaction</i> $Fe^{3+}$ $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$
$HO_2^{\cdot}$ rodnik wodoronadtlenkowy <i>hydroperoxide radical</i>	$O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$
$H_2O_2$ nadtlenek wodoru <i>hydrogen peroxide</i>	$O_2^{\cdot-} + 2H^+ + \bar{e} \rightarrow H_2O_2$ $O_2 + 2H^+ + 2\bar{e} \rightarrow H_2O_2$

Oprócz wyżej wymienionych form tlenu w układach biologicznych można spotkać również

inne niekorzystne jego formy, tj. jego alotropową odmianę – ozon ( $O_3$ ), rodnik peroksylogowy ( $LOO^{\cdot}$ ),

rodnik alkoksyłowy ( $LO^{\bullet}$ ), wodoronadtlenek lipidowy (LOOH), nadtlenoazotyn ( $ONOO^{\bullet}$ ), kwas podchlorawy (HOCl) (Bartosz, 2003).

Następstwem działania patologicznych stężeń reaktywnych form tlenu jest między innymi utlenianie błon komórkowych, peroksydacja lipidów i białek, inaktywacja enzymów, pęknięcia nici DNA (kwas deoksyrybonukleinowy), akumulacja produktów uszkodzeń oksydacyjnych. Tak poważne uszkodzenia prowadzą w konsekwencji do powstawania mutacji, a także sprzyjają procesom karcinogenezy (Bartosz, 2003; Zabłocka i Janusz, 2008). Poza niekorzystnymi działaniami, z jakimi kojarzone są RFT, odgrywają one istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych. Ich zadaniem jest regulacja procesów naprawczych, reakcje redukcji i utleniania w łańcuchu oddechowym, czy też regulacja ekspresji genów (Kalisz i in., 2007).

### **Stres oksydacyjny spowodowany mrożeniem i rozmrażaniem**

W biotechnologii rozrodu nieocenioną rolę odgrywa kriokonserwacja nasienia. Jest to jedna z biotechnik, wykorzystywana na szeroką skalę, która pozwala na rozpowszechnianie gamet najlepszych rozplodników, a tym samym poprawę jakości genetycznej stad hodowlanych (Watson, 2005; Gogol, 2012). Jednakże, największą przeszkodą w wykonywaniu prezerwacji nasienia jest to, że stosowanie samej procedury powoduje letalne lub sub-letalne zmiany plemników, tym samym zmniejsza żywotność i liczbę ruchliwych plemników. Około 40–50% populacji plemników zawartych w próbce ejakulatu nie przeżywa kriokonserwacji, nawet przy najbardziej zoptymalizowanych procedurach. Ponadto, aby zwiększyć prawdopodobieństwo zapłodnienia komórki jajowej, wymagana jest znacznie większa liczba w pełni sprawnych plemników w porównaniu do ‘świeżego’ nasienia (Bilodeau i in., 2000; Watson, 2005). Ejakulat podczas procedury mrożenia i rozmrażania zostaje narażony na wiele potencjalnie szkodliwych czynników. Są to między innymi, stres osmotyczny wynikający z obecności molowych stężeń krioprotektanu, a także po-

wstawanie i rozpuszczanie się kryształów lodu wewnątrz komórek (Watson, 2005; Mostek i in., 2017). Rozmrożenie próbki ejakulatu powoduje nagłą i drastyczną zmianę temperatur (z  $-190^{\circ}C$  do  $37^{\circ}C$ ) w ciągu 60 sekund. Tak gwałtowny wzrost temperatury generuje drastyczne zmiany w produkcji reaktywnych form tlenu (Chatterjee i Gagnon, 2001; Kadirvel i in., 2009). Wykazano, że podczas procedury rozmrażania ejakulatów już w ciągu pierwszych 15 s dochodzi do gwałtownego zwiększenia liczby wytwarzanych  $NO^{\bullet}$ . W przypadku  $O_2^{\bullet}$  obserwowano jego stały wzrost już od 45 s aż do co najmniej 5 min po rozmrożeniu próbki. Wyższe stężenia reaktywnych form tlenu mogą powstawać również podczas kolejnych etapów procedury prezerwacji nasienia (Chatterjee i Gagnon, 2001). Plemniki zostają wówczas wystawione na działanie tlenu atmosferycznego, co przyczynia się do zwiększonej produkcji RFT (Bucak i in., 2010). Podczas fazy chłodzenia, kluczowej dla całego procesu krioprezerwacji także obserwuje się podniesiony poziom anionorodnika ponadtlenkowego. Nie wykazano jednak zmian w stężeniach nadtlenku wodoru (Chatterjee i Gagnon, 2001; Ahmad i in., 2015). Być może, jest to spowodowane lepszym powinowactwem  $O_2^{\bullet}$  do  $NO^{\bullet}$  i formowaniem pozostałych RFT. Innym wyjaśnieniem braku różnic w poziomie  $H_2O_2$  w mrożonym nasieniu może być fakt, że fizjologiczne reakcje zachodzące w komórkach mogą przyczyniać się do metabolizowania tej cząsteczki (Chatterjee i Gagnon, 2001).

### ***Wpływ stresu oksydacyjnego na funkcje i przeżywalność plemników***

Prawidłowa budowa błony komórkowej, DNA, jak również właściwe funkcje mitochondriów są niezbędne do zapłodnienia i dalszego rozwoju płodu (Watson, 2005). W utworzeniu i utrzymaniu homeostazy komórkowej kluczową rolę odgrywa nienaruszona struktura błony cytoplazmatycznej plemnika. W skład błony wchodzi w większości fosfolipidy, które asymetrycznie rozłożone tworzą tzw. dwuwarstwę. Po jej wewnętrznej stronie zlokalizowane są fosfatydylo-

seryna (PS) oraz fosfatydyloetanolamina (PE), z kolei po zewnętrznej stronie znajdują się sfingomielina (SM) i fosfatydylocholina (PS). Asymetria ta jest stale utrzymywana przez działanie kilku kompleksów translokaz, zależnych od ATP (Adenozyno-5'-trifosforan) (Januskauskas i in., 2003). W dostępnej literaturze naukowej istnieją opisy mechanizmów wyjaśniających obniżenie ruchliwości plemników, wywołanej przez stres oksydacyjny. Jednym z najczęściej cytowanych jest peroksydacja lipidów błon komórkowych. To właśnie duża zawartość wielonasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w błonie cytoplazmatycznej plemników powoduje, że komórki te stają się bardzo wrażliwe na stres oksydacyjny (Aurich, 2005; Kadirvel i in., 2009). Wykazano, że próbki nasienia buhajów poddane procesowi kriokonserwacji generowały znacznie wyższe ilości anionorodnika ponadtlenkowego, co doprowadziło do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej, utraty jej płynności, a także obniżenia progresywnej ruchliwości plemnika (Chatterjee i Gagnon, 2001; Ahmad i in., 2015). Porównywana ruchliwość plemników poddawanych mrożeniu/rozrożeniu była znacznie krótsza (do 6 godzin) aniżeli plemników 'świeżych'. Komórki nie poddawane procesom biotechnicznym najniższy poziom ruchu progresywnego wykazywały dopiero w 12. godzinie inkubacji (Ahmad i in., 2015). Odrębna analiza nasienia buhajów poddanego procesowi rozmrażania wyraźnie wykazała zwiększoną przepuszczalność błony cytoplazmatycznej (Martin i in., 2004). Ten wynik pozostaje zgodny z efektami kriokonserwacji obserwowanymi zwykle w błonach komórkowych. Ponadto zaobserwowano, że proces mrożenia i rozmrażania próbki indukuje przedwczesne dojrzewanie (kriokapacytację) o specyficznym mechanizmie oraz pozorną reakcję akrosomalną plemników (Cormier i Bailey, 2003; Neild i in., 2003). Z kolei, badania przeprowadzone przez O'Flaherty i in. (1997) wykazały udział reaktywnych form tlenu w zbyt wczesnej kapacytacji komórek plemnikowych (O'Flaherty i in., 1997). Sugeruje się również, że wielonasycone kwasy tłuszczowe mogą tworzyć wtórne produkty, które

następnie utleniają białka obecne w plemnikach. Zwiększony poziom RFT prowadzi do wzmożonej karbonylacji białek, będącej wskaźnikiem ogólnej oksydacji białek. Karbonylowane proteiny, oznaczone w badaniach, biorą udział w wielu ważnych funkcjach fizjologicznych plemników. Są to między innymi: organizacja cytoszkieletu oraz flagelli, detoksykacja, czy metabolizm energii. Ponadto, większość karbonylowanych białek jest również zaangażowana w kapacytację plemników (Mostek i in., 2017).

Niewątpliwie ważnym aspektem w określaniu jakości nasienia jest kondycja jego DNA. Integralność kwasu nukleinowego jest istotna dla powodzenia zapłodnienia, a także rozwoju płodu (Lone i in., 2017). Pomimo tego, że jądro komórkowe jest uważane za dosyć stabilne organellum, to ze względu na obecność błony może być narażone na działanie RFT, generowanych podczas procesu kriokonserwacji (Watson, 2005). Reakcje reaktywnych form tlenu z kwasem DNA przyczyniają się do powstania wielu uszkodzeń oksydacyjnych. Są to między innymi: pęknięcia nici, uszkodzenia pojedynczych zasad, czy tworzenie tzw. adduktów objętościowych (bulky adducts) (Przybyszewski i in., 2005). Wykazano, że w fizjologicznych warunkach buhaje charakteryzujące się wysoką płodnością posiadają około 1,2–3% uszkodzeń materiału genetycznego. Zwiększenie tego odsetka wpływa niekorzystnie na płodność zwierzęcia (Bochenek i in., 2001). Zaobserwowano także związek pomiędzy wczesnymi zmianami błony komórkowej a uszkodzeniami DNA komórek poddanych kriokonserwacji. Obecność plemników z zaburzonymi funkcjami błony komórkowej była skorelowana z odsetkiem komórek wykazujących nieprawidłową kondensację chromatyny. Te trwałe zmiany w materiale genetycznym miały z kolei negatywny wpływ na płodność buhajów (Anzar i in., 2002; Januskauskas i in., 2003). Kadirvel i in. (2009) jednoznacznie wskazali na wpływ reaktywnych form tlenu na wzrost uszkodzeń DNA plemników podczas przechowywania w niskiej temperaturze. Generowanie RFT przez komórki wzrastało liniowo aż do 72 godzin inkubacji. Niemniej jednak,

procent rodników tlenowych był znacznie wyższy już po 24 i 48 godzinach w porównaniu do 'świeżego' nasienia. Poziom fragmentacji materiału genetycznego również wzrastał wraz z czasem przechowywania (Kadirvel i in., 2009). DNA wystawione na działalność stresu oksydacyjnego może mieć również niekorzystny wpływ na rozwój zapłodnionej komórki jajowej. Uszkodzony materiał genetyczny zmniejsza szybkość podziałów zygoty, jak również zwiększa liczbę komórek apoptotycznych, które osiągnęły stadium blastocysty. Nieprawidłowe DNA może także doprowadzić do wcześniejszego obumarcia zarodka lub śmierci w późniejszych fazach ciąży (Simoes i in., 2013). Istnieją również badania, w których nie wykazano wpływu RFT lub samego procesu kriokonserwacji na uszkodzenia DNA plemnika (Martin i in., 2004; Celeghini i in., 2008). Jednak, aby dokładniej poznać i zrozumieć mechanizm działania reaktywnych form tlenu, jak i procesów mrożenia należy przeprowadzić więcej badań analizujących te zależności.

Stres oksydacyjny spowodowany procesem konserwacji próbek nasienia może wpływać również na kondycję błony mitochondrialnej, a tym samym funkcje mitochondriów. Mitochondria plemnika różnią się nieco od tych samych struktur obecnych w komórkach somatycznych. Dojrzałe organelle mają półksiężycowaty kształt i wykazują znaczną kondensację swojej struktury. Każde z mitochondriów otoczone jest białkową torebką, w której jest zawartych wiele strukturalnych oraz enzymatycznych białek o charakterze antyoksydacyjnym. Organelle te łączą się ze sobą tworząc osłonkę, która ma za zadanie ochronić je przed działaniem czynników fizykochemicznych (Piasecka, 2004). RFT obecne w kriokonserwowanej próbce nasienia mogą mieć związek z obniżeniem potencjału mitochondrialnego. Obserwowano 2,5-krotne obniżenie potencjału błon mitochondrialnych plemników kriokonserwowanych w porównaniu do próbki 'świeżej'. Tak znaczny spadek tej wartości przekładał się na zmniejszenie ruchu progresywnego komórek (Kadirvel i in., 2009). W innym badaniu również wykazano wpływ procesu mrożenia i rozmraża-

nia na mitochondria. Funkcje tych kompartmentów komórkowych były niższe o około 50% w porównaniu do nasienia nie poddawanego obróbce termicznej (Celeghini i in., 2008).

### **Omówienie wyników**

Krioprezerwacja nasienia buhajów zwiększa dostępność najlepszego materiału genetycznego do inseminacji krów. Niestety, płodność mrożonego nasienia nie jest tak wysoka, jak nasienia świeżego, pobranego od buhaja. Kriokonserwacja indukuje wiele różnych uszkodzeń plemników. Wśród kilku rozważanych czynników przyczyniających się do zmian i uszkodzeń męskich gamet wskazuje się udział stresu oksydacyjnego oraz reaktywnych form tlenu. Podczas kriokonserwacji ejakulatu plemniki zostają narażone na powstawanie ponadfizjologicznych ilości RFT (Watson, 2000). Reaktywne formy tlenu wywierają niekorzystny wpływ na funkcje tych komórek. Ich nagromadzenie przyczynia się do nieodwracalnych zmian skutkujących obniżeniem jakości nasienia buhajów, a także powoduje śmierć komórek wywołaną mechanizmami apoptotycznymi (Aurich, 2005). Zarówno translokacje fosfatydoloseryny (PS) do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej, jak też zwiększona jej przepuszczalność, przedwczesna kapacytacja oraz reakcja akrosomalna plemników wskazują na indukowane zmiany apoptotyczne. Ponadto, w wyniku peroksydacji lipidów i utraty integralności błony cytoplazmatycznej zwiększa się jej przepuszczalność. Prowadzi to do nieregulowanej ucieczki jonów oraz enzymów niezbędnych do generowania energii, potrzebnej do ruchu plemnika (Kadirvel i in., 2009). Konsekwencja uszkodzeń oksydacyjnych dotyczy również mitochondriów. RFT przyczyniają się do obniżenia potencjału mitochondrialnego oraz wyczerpywania się zapasów ATP. Utrata prawidłowych funkcji tego organelum prowadzi do obniżenia ruchliwości plemników (Martin i in., 2004; Kadirvel i in., 2009). Nie zostało do końca wyjaśnione, czy uszkodzenia DNA nasienia buhajów są bezpośrednio związane z RFT. Niemniej jednak, sam proces zapłodnienia oraz dalszy los zarodków jest zależny od jakości wprowadzane-

go DNA. Inseminacja plemnikami z uszkodzonym DNA może prowadzić do wczesnych poronień lub niekorzystnych w hodowli bydła mutacji (Simoes i in., 2013).

Pomimo postępów w dziedzinie biotechniki, stosowania coraz to nowszych metod oceny jakości nasienia oraz określania nowych protokołów proces kriokonserwacji nadal powoduje

uszkodzenia wielu struktur komórkowych. Ponieważ stres oksydacyjny oraz reaktywne formy tlenu są niewątpliwie jednym z czynników przyczyniających się do upośledzenia funkcji plemników oraz w efekcie do pogorszenia jakości nasienia, ocena stężenia RFT powinna być brana pod uwagę przy wprowadzaniu ejakulatów do programu hodowlanego.

### Literatura

- Ahmad M., Ahmad N., Riaz A., Anzar M. (2015). Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. *Reprod. Fertil.*, 27, 5: 784–793.
- Anzar M., He L., Buhr M.M., Kroetsch T.G., Pauls K.P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.*, 66, 2: 354–360.
- Aurich C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 89, 1–4: 65–75.
- Bartosz G. (2003). *Druga twarz tlenu*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Bilodeau J.F., Chatterjee S., Sirard M.A., Gagnon C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, 55, 3: 282–288.
- Bochenek M., Smorag Z., Pilch J. (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56, 4: 557–567.
- Bucak M.N., Tuncer P.B., Sariözkan S., Başpınar N., Taşpınar M., Cayan K., Bilgili A., Akalın P.P., Büyükleblebici S., Aydos S., Ilgaz S., Sunguroğlu A., Oztuna D. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61, 3: 248–253.
- Celeghini E.C., Arruda R.P. de, Andrade A.F. de, Nascimento J., Raphael C.F., Rodrigues P.H. (2008). Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim. Reprod. Sci.*, 104, 2–4: 119–131.
- Chatterjee S., Gagnon C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod.*, 59, 4: 451–458.
- Cormier N., Bailey J.L. (2003). A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 69: 177–185.
- Czajka A. (2006). Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Now. Lek.*, 75, 6: 582–586.
- Ghasemi M.V., Ghorbani A. (2014). Environmental and genetic factors affecting on semen quality in Iranian Holstein bulls. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, 4, 1: 33–37.
- Gogol P. (2012). Wpływ czasu przechowywania nasienia królika na parametry ruchu i zdolność zapładniającą plemników. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 39, 1: 97–104.
- Januskauskas A., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60, 4: 743–758.
- Kalisz O., Wolski T., Gerkowicz M., Smorawski M. (2007). Reaktywne formy tlenu (RFT) oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób. *Ann. UMCS*, 62, 1: 87–99.
- Kadirvel G., Kumar S., Kumaresan A. (2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 114, 1–3: 125–134.

- Larson J.L., Miller D.J. (2000). Can relative spermatozoal galactosyltransferase activity be predictive of dairy bull fertility? *J. Dairy Sci.*, 83, 11: 2473–2479.
- Lone S.A., Shah N., Yadav H.P., Wagay M.A., Singh A., Sinha R. (2017). Sperm DNA damage causes, assessment and relationship with fertility: A review. *Theriogenology*, 7, 1: 13–20.
- Martin G., Sabido O., Durand P., Levy R. (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.*, 71, 1: 28–37.
- Mathevon M., Buhr M.M., Dekkers J.C. (1998). Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.*, 81, 12: 3321–3330.
- Mostek A., Dietrich M.A., Słowińska M., Ciereszko A. (2017). Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology*, 92: 95–102.
- Neild D.M., Gadella B.M., Chaves M.G., Miragaya M.H., Colenbrander B., Aguero A. (2003). Membrane changes during different stages of a freezethaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59: 1693–1705.
- O’Flaherty C., Beconi M., Beorlegui N. (1997). Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia*, 29, 5: 269–275.
- Piasecka M. (2004). Morfologia i funkcja mitochondriów plemnika a męska płodność. Część I. Prawidłowa morfologia i funkcja wstawki plemnika. *Post. Biol. Kom.*, 31, 3: 489–516.
- Przybyszewski W.M., Kasperczyk J., Stokłosa K., Bkhiyan A. (2005). Uszkodzenia DNA powodowane przez produkty peroksydacji lipidów. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 59: 75–81.
- Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L. (2008). Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 4: 1007–1015.
- Simoës R., Feitosa W.B., Siqueira A.F., Nichi M., Paula-Lopes F.F., Marques M.G., Peres M.A., Barnabe V.H., Vissintin J.A., Assumpcao M.E. (2013). Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. *Reproduction*, 146, 5: 433–441.
- Watson P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60–61: 481–492.
- Zabłocka A., Janusz M. (2008). Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 62: 118–124.

## **IMPACT OF OXIDATIVE STRESS ON FUNCTION AND QUALITY OF SEMEN FROM BREEDING BULLS**

### **Summary**

Cryopreservation is one of the most routinely used techniques in the artificial insemination (AI) of cattle. Though it has many advantages, one of the biggest obstacles to using this method is excessive damage of sperm functions. During freezing and thawing, cells are exposed to a number of harmful factors, such as sudden temperature changes, osmotic shock, formation of ice crystals or reactive oxygen species (ROS). In many physiological processes, like regulation of repair processes, regulation of gene expression, ROS play a crucial role. However, an excess of ROS can have harmful effect on the cell. Oxidative stress (OS), caused by overproduction of ROS, is thought to be one of the major factors contributing to the decrease of spermatozoa function and fertility. OS is mainly responsible for damage of plasma membrane, DNA fragmentation, mitochondrial depletion, premature capacitation and acrosome reaction. This paper reviews the impact of OS and ROS on sperm functions and semen quality.

**Key words:** oxidative stress, bulls, semen quality, sperm function