

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

ЕФЕКТ НА ВИТАМИН Е И ЦИСТЕИН ВЪРХУ КРИОКОНСЕРВИРАНА СЕМЕННА ТЕЧНОСТ ОТ БИК

ТАНЯ ТОДОРОВА

Институт по животновъдни науки – Костинброд

Сперматозоидите на бозайниците съдържат висок процент от полиненаситени мастни киселини и поради това са особено податливи към оксидативни увреждания. Тяхната уязвимост особено се увеличава след криоконсервация с последваща загуба на целостта на мембраните, нарушена клетъчна функция, намалена подвижност и оплодителната способност на семенната течност при изкуствено осеменяване (ИО). Образуването на реактивни оксидативни субстанции (РОС) е нормален физиологичен процес в различни органи (Plessis, S. S. Du et al., 2008). Въпреки това, образуването на по-големи количества РОС може да предизвика структурна повреда на сперматозоидните мембрани. За да се противодейства на разрушителните ефекти на РОС, семенната плазма има антиоксидантна система, която е от голямо значение за защитата на сперматозоидите.

Много антиоксиданти се оказаха полезни при лечение на мъжки инфертилитет чрез контролиране нивото на РОС, за да се поддържа подвижността и преживяемостта на сперматозоидите (Sharma and Agarwal, 1996). Цистеинът и витамин Е са естествени инхибитори на свободните радикали и тяхното присъствие също така подпомага различни други механизми за намаляване на многобройните разрушителни процеси предизвикани от свободни радикали, включително ЛПО (липидната пероксидация).

Цистеинът е тиолово съединение, което може да пенетрира плазмената мембрана и е прекурсор на интрацелуларния синтез на глутатион. Известно е, че цистеинът протектира

сперматозоидите от токсичните оксидни метаболити, които предизвикват липидна пероксидация на спермалните плазмени мембрани при *in vitro* условия (Meister and Tate, 1976). Funahashi and Sano (2005) докладват, че спермален разреждател с добавен 5 mM цистеин подобрява преживяемостта и мембрания интегритет на замразени сперматозоиди от нерез.

Витамин Е включва група от липидно разтворими съединения, токофероли и токотриеноли, които действат като антиоксиданти и защитават организма от оксидативен стрес. Смята се, че витамин Е е основен компонент на антиоксидантната система на сперматозоидите и е един от най-големите протектори на мембраните срещу РОС и ЛПО. Той не се синтезира в клетките на бозайниците и след като мембраният токоферол се изконсумира по време на периода на оксидативен стрес, клетъчните липиди са предмет на пероксидация, която може да доведе до токсични увреждания. Витамин Е може да инхибира липидната пероксидация при реакцията в мембраната чрез премахване на пероксидни (ROO[•]), алкоксилни (RO[•]) и други радикали с липиден произход. Доказано е, че добавки, съдържащи витамин Е спомагат за увеличаване на обема на семенната течност и концентрацията на сперматозоидите при нерези, говеда, зайци и кочове. Въпреки това, има ограничени данни относно ефектите на цистеина и на витамин Е в различни разреждатели върху качеството на семенната течност (Uysal and Bucak, 2007).

Целта на нашите изследвания бе да тестваме

хипотезата, че различните нива на витамин Е и цистеин могат да защитават ефективно семенна течност от бик против оксидативно увреждане по време на криоконсервация в различни разреждатели и да доведат до по-висока жизнеспособност и подвижност на сперматозоидите след размразяване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

При експериментите бе използвана замразена семенна течност от един бик. При замразяването бяха използвани два вида разреждатели – цитратен разреждател (ЦР) и TRIS буферен разреждател (ТР) с добавен 7% глицерин. Определянето на концентрацията на сперматозоидите бе извършвана по стандартен метод в камера на Тома, а подвижността бе определяна визуално. Жизнеността на сперматозоидите беше определяна чрез оцветяване с Eosin - Nigrosin.

Експериментални разреждатели

Три пайети се размразяват при 37°C в продължение на 30 s. Семенната течност се разрежда до концентрация от $30 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ сперматозоиди с цитратен разреждател ЦР (натриев цитрат 2.9 g dL^{-1} , пеницилин 1000 IU ml^{-1} , стрептомицин $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) и двойно дестилирана вода, за да се постигне обем 100 mL или трис-яйчен жълтък (ТР) разреждател (трис (хидроксиметил) аминотетан (TRIS) 3.028 g, лимонена киселина монохидрат 1.675 g, фруктоза 1.25 g; пеницилин G натрий 1.000 IU ml^{-1} ; стрептомицин сулфат $1.000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ и двойно дестилирана вода до обем от 100 ml), съдържащ 20% яйчен жълтък и 7% глицерол. Разредената семенна течност е разделена на 5 равни части, включително контрол и четири експериментални групи.

Към всяка аликвотна част с изключение на контролата се добавят 0.1 mM, 0.2 mM витамин Е съответно 5 mM, 10 mM цистеин.

Подвижност на сперматозоидите след размразяване

Прогресивните движения на сперматозоидите бяха преценени с помощта на фазово контрастна микроскопия (200 x), при 37°C. Върху затоплено предметно стъкло (37°C) се накапва 5 μl капка и се покрива с покривно стъкло. Отчитат се три микроскопски полета за всяка проба и средната стойност се приема за краен резултат на подвижността.

Живи и мъртви сперматозоиди

Те се преценяват чрез стандартното еозин – нигрозиново оцветяване. Разтворът съдържа Eosin (0.67 g) и Nigrosin (5 g) в 100 ml. Капка от разредената семенна течност се смесва с осем капки от разтвора и се инкубира при 30°C в продължение на 5 min Върху затоплено предметно стъкло се правят натривки и се оставят да изсъхнат при 30°C. Излишният оцветител се измива с течаща вода. Натривката се потапя в етанол за премахване на водата. Преброяват се средно 400 сперматозоида.

Липидна пероксидация (ЛПО)

Една аликвотна част (500 μl) семенна течност от всяка проба се центрофугира при $800 \times g$ за 10 min; сперматозоидният пелет се отделя и се промива чрез ресуспендиране в PBS буфер и повторно се центрофугира (три пъти). След последното центрофугиране 1 ml дейонизирана вода се прибавя към сперматозоидите и те се замразяват директно и се съхраняват при -70°C до по-нататъшен анализ. Пробите се размразяват преди анализа на липидната пероксидация. Концентрациите на малондиалдехида (МДА), като показател на ЛПО в спермалните проби, се измерват с помощта на тиобарбитурова киселинна реакция, съгласно метода на **Placer et al.** (1966). Количественото определяне на реактивни вещества към тиобарбитурова киселина се извършва чрез сравняване на абсорбцията при 532 nm със стандартната крива на МДА еквивалентите, генерирани от киселинно катализирана хидролиза на 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane. МДА концентрациите са изразени в $\text{nmol } 10^{-9}$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Експериментът бе повторен трикратно. Резултатите се дават като средно \pm SEM. Статистическите анализи бяха проведени с използване General Linear Model процедурите (GLM) на SPSS версия 16.0, следвани от пост-хок тест на Tukey. P-стойности по-малки от 0.05 се смятат за достоверни. Данни за ефекта на цистеина върху замразени - размразени сперматозоиди от бик в цитратен сперморазреждател (ЦР) са показани в табл. 1.

Резултатите в табл. 1 показват, че най-ниска-

та стойност на малондиалдехида (МДА), като показател за липидната пероксидация (ЛПО), се наблюдава при добавяне на 5 mM цистеин. Преживяемостта на сперматозоидите не се променя значително с добавянето на различни концентрации цистеин към цитратен сперморазредител (ЦР) в сравнение с контролната група. Подвижността на сперматозоидите е значително по-висока ($P < 0.05$) в опитните групи, с добавени 5 - съответно 10 mM цистеин в сравнение с контролната група

Данните за влиянието на цистеина върху замразена / размразена семенна течност от бик в трис-яйчен жълтък (ТР) сперморазредител са показани в табл. 2.

Концентрацията на липидната пероксидация (ЛПО) не се променя значително с добавянето на цистеин в трис-яйчен жълтък (ТР) сперморазредител в сравнение с контролната група. Няма достоверна разлика в жизнеспособността и подвижността на сперматозоидите след

размразяването и добавянето на цистеин към трис-яйчен жълтък (ТР) сперморазредител.

Ефектът на витамин Е върху замразена - размразена семенна течност от бик в цитратен сперморазредител (ЦР) е представен в табл. 3.

Най-ниската стойност на малондиалдехида (МДА), като показател за липидната пероксидация (ЛПО), се получава при добавяне на 0.1 mM витамин Е към разредителя в сравнение с контролната група ($P < 0.05$). Добавянето на 0.1 mM витамин Е към разредителя доведе до най-високата ($P < 0.05$) жизнеспособност и подвижност на сперматозоидите след размразяването в сравнение с контролната група (табл. 3).

Данните от ефекта на витамин Е върху замразена - размразена семенна течност от бик в трис-яйчен жълтък сперморазредител (ТР) са представени в табл. 4.

Сперматозоидите на бозайници са силно чувствителни към липидната пероксидация (ЛПО), което се появява вследствие на окислява-

Таблица 1. Ефект на цистеина върху замразени - размразени сперматозоиди от бик в цитратен сперморазредител (ЦР).

Table 1. Effect of cysteine on frozen/thawed bovine spermatozoa in citrate extender

	Концентрации/ Concentration		
	Контрол/Control	5 mM	10 mM
MDA (nmol 10 ⁻⁹)	1.96 ± 0.28 ^a	1.45 ± 0.33 ^b	2.20 ± 1.01 ^c
Преживяемост % Viability	62 ± 3 ^a	71 ± 3 ^a	75 ± 4 ^a
Подвижност % Motility	47 ± 1 ^a	60 ± 3 ^b	64 ± 4 ^b

Различните букви (a, b, c) показват достоверните разлики ($P < 0.05$)

Таблица 2. Ефект на цистеина върху замразени - размразени сперматозоиди от бик в трис-яйчен жълтък сперморазредител (ТР).

Table 2. Effect of cysteine on frozen/thawed bovine spermatozoa in tris-egg yolk extender

	Концентрации/ Concentration		
	Контрол/ Control	5 mM	10 mM
MDA (nmol 10 ⁻⁹)	6.65 ± 0.99 ^a	5.92 ± 0.34 ^a	6.01 ± 0.43 ^a
Преживяемост % Viability	55 ± 4 ^a	67 ± 3 ^a	62 ± 1 ^a
Подвижност % Motility	47 ± 1 ^a	57 ± 5 ^a	57 ± 0.00 ^a

Еднаквите букви показват недостоверните разлики

Таблица 3. Ефект на витамин Е върху замразена - размразена семенна течност от бик в цитратен сперморазредител (ЦР).

Table 3. Effect of vitamin E frozen/thawed bovine spermatozoa in citrate extender

	Концентрации/ Concentration		
	Контрол/ Control	0.1 mM	0.2 mM
MDA (nmol 10 ⁻⁹)	4.00 ± 0.04 ^a	1.01 ± 0.06 ^b	1.20 ± 0.8 ^b
Преживяемост % Viability	53 ± 1 ^a	68 ± 2 ^b	63 ± 1 ^b
Подвижност % Motility	44 ± 3 ^a	58 ± 4 ^b	53 ± 5 ^b

Различните букви (a, b, c) показват достоверните разлики ($P < 0.05$)

Таблица 4. Ефект на витамин Е върху замразена - размразена семенна течност от бик в трис-яйчен жълтък сперморазредител (ТР).

Table 4. Effect of vitamin E on frozen/thawed bovine spermatozoa in tris-egg yolk extender

	Концентрации/ Concentration		
	Контрол	0.1 mM	0.2 mM
MDA (nmol 10 ⁻⁹)	7.94 ± 0.16 ^a	5.62 ± 1.46 ^a	6.26 ± 0.56 ^a
Преживяемост % Viability	47 ± 3 ^a	57 ± 4 ^a	52 ± 5 ^a
Подвижност % Motility	41 ± 1 ^a	51 ± 5 ^a	44 ± 6 ^a

Еднаквите букви показват недостоверните разлики

не на мембранните липиди, от частично редуцирани кислородни молекули, например супероксид, водороден пероксид и хидроксилни радикали. Спонтанната липидна пероксидация (ЛПО) на мембраните на сперматозоиди от бозайници разрушава структурата на липидната матрица. Тези увреждания в крайна сметка водят до увреждане на функцията на семенната течност, както подвижността на сперматозоидите, функционалната цялост на мембраните и на оплодителните качества. Освен това водят до изтичане на вътреклетъчни ензими и увреждане на ДНК на сперматозоидите чрез оксидативен стрес и производството на цитотоксични алдехиди.

Ниската токсичност и добрата разтворимост на цистеина подпомага неговото приложение като антиоксидант. Доказано е, че има предпазен ефект, когато се добави към сперморазредителя. В настоящото проучване по-добрият ефект на цистеина (10 mM) върху стой-

ността на липидната пероксидация (ЛПО) се наблюдава в цитратен сперморазредител (ЦР) (табл. 1) и това е в съответствие с някои наши предишни проучвания. Тези резултати могат да се обяснят въз основа на факта, че цистеинът помага за синтезирането на глутатион, един от най-важните природни антиоксиданти и детоксикатори. Глутатионът действа като мощен антиоксидант в семенната течност и разлага радикалите до по-малко вредни метаболити.

Цистеинът предпазва сперматозоидите чрез предотвратяване на ендогенната оксидация на ДНК и уврежданията на мембраните. Добавянето на цистеин към трис-яйчен жълтък сперморазредител (ТР) разредител в различна концентрация не предизвиква ефект върху намаляването на липидната пероксидация (ЛПО) в сравнение с контролната група (табл. 2). Освен това, резултатите от това изследване показват, че добавянето на цистеин към цитратен спер-

моразредител (ЦР) увеличава подвижността на сперматозоидите след размразяване. Най-висока стойност на малондиалдехида (МДА) се наблюдава при добавяне на 10 mM цистеин към цитратен сперморазредител (ЦР). Резултатите изследването ни показват още, че добавянето на цистеин в ЦР разредител понижава вредния ефект на свободните радикали в семенна течност от едър рогат добитък. Една от основните причини за намалена жизнеспособност след еквилибрацията може да се дължи на отрицателния ефект от глицерола.

Резултатите нашия опит сочат, че добавянето на 0.1 mM витамин Е към цитратен сперморазредител (ЦР) доведе до значително намаляване на ЛПО продукти, като например малондиалдехида (МДА) в сравнение с контролната група. Това кореспондира с проучване, извършено от **Verma and Kanwar (1999)**, което отбелязва, че 0.1 mM витамин Е намалява образуването на липидната пероксидация (ЛПО).

Настоящото проучване потвърждава зависимо от дозата намаляване на производството на липидната пероксидация (ЛПО), когато различни дози на витамин Е се добавят към семенни проби. Витамин Е, като липидно разтворим антиоксидант, също играе важна защитна роля срещу оксидативния стрес и пречи на производството на липидни пероксиди чрез свързване на свободните радикали (особено силно поглъщане на хидроксилни радикали), които са токсични странични продукти на много метаболитни процеси в биологичните мембрани. Но при добавянето на витамин Е към трис-яйчен жълтък сперморазредител (ТР) концентрацията на липидната пероксидация (ЛПО) не се променя в сравнение с контролната група.

Предишни изследвания показват, че витамин Е подобрява качеството и количеството на семенната течност. **Brzezinska - Slebodzinska et al. (1995)** установяват, че добавки с витамин Е водят до значително увеличаване на броя на сперматозоидите при нерези. Освен това, въздействието на витамин Е (токоферол) върху подвижността на сперматозоидите варира от негативно при прясна човешка семенна течност и семенна течност от коч до малък или никакъв

ефект при охладена семенна течност от жребец или човек. В това проучване прибавяне на 0.1 mM витамин Е към цитратен сперморазредител (ЦР) доведе до значително подобряване на подвижността и жизнеспособността на сперматозоидите в сравнение с контролната група.

Ефектът на витамин Е, отбелязан в настоящото изследване, може да се дължи на неговите антиоксидантни качества, подобни на тези, съобщени от **Cerolini et al. (2000)**, **Akiyama (1990)**, **Sen et al. (2004)**, **Surai et al. (1998)**, че добавки с витамин Е намаляват образуването на свободни радикали и подобряват качеството на семенната течност при животните. Въпреки това, обогатяването на трис-яйчен жълтък сперморазредител (ТР) с различни дози витамин Е не доведе до подобряване жизнеспособността и подвижността на сперматозоидите в сравнение с контролната група.

ИЗВОДИ

Цистеинът и витамин Е са много ефективни антиоксиданти в цитратен сперморазредител (ЦР) и че добавянето им към такъв сперморазредител може да намали оксидативния стрес, предизвикан от размразяването и защитава сперматозоидите от говеда при криоконсервация. Добавянето на цистеин и витамин Е към трис-яйчен жълтък сперморазредител (ТР) не води до подобряване качеството на семенната течност. Резултатите от това проучване предоставят нов подход за криоконсервация на семенна течност от бик и може да допринесат за подобряване на резултатите от криоконсервацията на семенна течност в промишленото животновъдство.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Akiyama M.**, 1990. *In vivo* scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nippon. Hinyokika. Gakkai Zasshi*; 90: 421–428.
2. **Brzezinska-Slebozinska, E., A. B. Slebozinski, B. Pietras and G. Wiczorek**, 1995. Anti-oxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid

peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Trace Element Res.*, 47: 69-74.

3. Cerolini, S., P. Surai, G. Mangiagalli, L. G. Gavalchini and R. C. Noble, 2000. Effect of n3 and n6 fatty acid supplemented diet and vitamin E level on semen quality in cockerels *Br. Poult. Sci.*, 41 (Suppl. 1): 8-10.

4. Funahashi, H. and Sano, T., 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C *Theriogenology*. Apr 1;63(6):1605-16.

5. Meister, A. and Tate, S., 1976. Glutathione and related γ -glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45:559-604.

6. Plessis, S. S. Du, Makker K., Desai N. R. and Agarwal A., 2008. Impact of oxidative stress on IVF Expert Review of Obstetrics and Gynecology, vol. 3, no. 4, pp. 539-554.

7. Verma, A and Kanwar K. C., 1999. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid

peroxidation *in vitro*. *Asian J. Androl.*, 1: 151-154.

8. Sen, C. K., Khanna S. and Roy S., 2004. Tocotrienol: the natural vitamin E to defend the nervous system? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1031, 127-142.

9. Surai, P. F., Kostjuk I., Wishart G., MacPherson A., Speake B. K., Noble R. C., Ionov I. and Kutz E., 1998c. Effect of vitamin E and selenium in cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes and liver *Biological Trace Element Research* 64,119-132.

10. Sharma, R. K. and Agarwal, A., 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility *Urology*, vol. 48, no. 6, pp. 835-850.

11. Uysal, O. and Bucak, M. N., 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen *Acta Veterinaria Brno*, vol. 76, no. 3, pp. 383-390.

EFFECT OF VITAMIN E AND CYSTEINE ON CRYOPRESERVED BULL SEMEN

T. Todorova

Institute of Animal Science - Kostinbrod

SUMMARY

Aim of our study was to test the hypothesis that the different levels of vitamin E and cysteine can protect effectively bull sperm against oxidative damage during cryopreservation in various diluents and lead to greater viability and motility of the sperm after thawing.

The results show that the lowest amount of malondialdehyde (MDA), as an indicator of lipid peroxidation (CLP) was observed with the addition of 5 mM cysteine to citrate sperm extender.

The lowest value of malondialdehyde (MDA) as an indicator of lipid peroxidation (CLP) was observed after adding 0.1 mM vitamin E to citrate sperm extender.

Based on these results, we reach the conclusion that cysteine and vitamin E are very effective antioxidants in citrate sperm extender (CR) and that their addition to such one can reduce oxidative stress caused by thawing and protects bovine sperm by cryopreservation. The addition of cysteine and vitamin E to Tris - egg yolk sperm extender (TP) does not improve the quality of the semen. The results of this study provide a new approach to cryopreservation of semen from a bull, and can help to improve the results of cryopreservation of semen in industrial farming.