

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ**ВЛИЯНИЕ НА ПЕНТОКСИФИЛИНА И НОВОСИНТЕЗИРАНИ  
ОРИГИНАЛНИ МЕТИЛКСАНТИНИ ВЪРХУ ФУНКЦИОНАЛНИТЕ  
ПОКАЗАТЕЛИ НА СПЕРМАТОЗОИДИТЕ ПРИ ЖИВОТНИТЕ**

ПЕТЪР ПЕТРОВ, ТАНЯ ТОДОРОВА, ПЛАМЕН ТОДОРОВ\*, ЯНЧО ТОДОРОВ

Институт по животновъдни науки-Костинброд

\*Институт по биология и имунология на размножаването-БАН-София

С въвеждането на новите технологии за обработка и съхранение на семенната течност броят на мъжките разплодници все повече намалява. Това позволява да се прави все по-прецизна селекция на тези носители на ценен генетичен материал, водеща до бърз генетичен прогрес. Целта е получаване на по-голям брой приплоди от един мъжки разплодник чрез изкуствено осеменяване, използвайки замразена семенна течност.

В резултат на криоконсервацията се наблюдава съществено намаляване (с около 50%) на подвижността, преживяемостта и оплодителната способност на сперматозоидите. След размразяването на семенната течност вътреклетъчната концентрация на ц.АМФ е около 3 пъти по-ниска в сравнение с концентрацията му преди замразяване. Това прави актуален въпроса за търсене на ефективни стимулатори на мотилитета на сперматозоидите. Тези стимулатори могат да бъдат използвани при криоконсервацията на семенната течност. В практиката като стимулатори на мотилитета на сперматозоидите се използват както физични, така и химични методи - доказано е стимулиращото въздействие на нискоинтензивното лазерно облъчване, електромагнитното или УЗ-третиране с честота на вълната 880 kHz и интензитет  $0,8^{-1}$  W/cm.

Като основен недостатък на физичните стимулатори следва да се отбележи необходимостта от специална и скъпоструваща техника, а също и недостатъчно проучения ефект на

този вид въздействие върху генома на сперматозоида.

От химичните субстанции най-често се използват каликреин, карнитин и ацетилкарнитин (Guraya, 1987), стероидни хормони - тестостерон, андростерон, 17d-естрадиол, прогестерон, "sperm motility stimulating mixture" (Gardner et al., 2002), растежни фактори - "epididmal factor", "sperm motility factor", "platelet activating factor" (PAF) (Guraya, 1987; Fauser, 2003). В това отношение се възлагат големи надежди на веществата от групата на ксантиновите производни - кофеин (Наков, 1987), теофилин (Guraya, 1987), пентоксифилин (Tourna et al., 1994). Това са съединения от групата на пуриновите алкалоиди, които нормално се срещат в телесните тъкани, флуиди и в растенията. Те действат като конкурентни неселективни инхибитори на цикличната нуклеотидна фосфодиестераза, което води до повишаване на интраклетъчния ц.АМФ (Essayn, 2001). Действат и като неселективни аденозинови рецепторни антагонисти, което води до потискане на сънотворното действие на аденозина (Daly et al., 1987). Участват в синтеза на ДНК и РНК, инхибират TNF-alpha, който предизвиква апоптозна клетъчна смърт и е отговорен за развитието на тумори. (Deree et al., 2008; Marques et al., 1999). В медицината се използват като слаби стимуланти и бронходилататори.

В тази връзка любезно ни бяха предоставени от колектив на Катедра "Фармацевтична

химия” към БАН няколко оригинални новосинтезирани метилксантинови производни под кодове VZ1, VZ4, VZ5, етоксифилин и пентоксифилин.

Целта на изследването беше:

1. Да се изследва какво е влиянието на метилксантините - VZ1, VZ4, VZ5, етоксифилин и пентоксифилин върху мотилитета на сперматозоидите в криоконсервирана семенна течност.

2. Да се направи сравнително изследване на горепосочените препарати и те да бъдат подредени по силата си на въздействие върху подвижността на сперматозоидите в криоконсервирана семенна течност.

3. Да бъдат предложени подходящи концентрации на горепосочените препарати, с които те оказват оптимално въздействие върху мотилитета на сперматозоидите в криоконсервирана семенна течност и прилагането им в практиката.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследванията бяха проведени през периода март - септември 2010 г. в Института по животновъдни науки - Костинброд. Като опитен материал бе използвана криоконсервирана говежда семенна течност, получена от ИАСРЖ гр. София. Предварителна серия от експерименти целеше да се установи коя от трите вида хранителни среди - натриев цитрат, Medium-199 и DMEM F-12, е най-подходяща за разтваряне на изпитваните субстанции, също така какво е тяхно въздействие върху самите сперматозоиди. За целта след размразяване на семенната течност при температура 38°C за 2-3 min в инкубатор тя бе разреждана в чисти хранителни среди и хранителни среди, съдържащи изследваните субстанции в концентрация 3.6  $\mu\text{mol/l}$  и 7.2  $\mu\text{mol/l}$ . Тези концентрации бяха избрани, тъй като редица автори (Tournaye et al., 1994, Sharma et al., 1996) ги посочват като най-подходящи за прилагане при криоконсервирана семенна течност.

Така разредените еякулати бяха инкубирани при температура 38°C, като на всеки 60 минути се отчиташе мотилитетът на сперматозоидите.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. **Влияние на хранителните среди върху сперматозоидите и изследваните субстанции.** В хода на изследванията се установи, че хранителна среда DMEM F-12 действа неблагоприятно върху подвижността и преживяемостта на сперматозоидите. Те умираха почти веднага след поставянето им в тази хранителна среда. Също така се установи, че субстанциите VZ4 и VZ1 много трудно се разтварят и в трите вида хранителни среди. При тях се налагаше по-продължително разбъркване с магнитна бъркалка, за да се разтворят (табл. 1).

2. **Влияние на изпитваните метилксантини върху мотилитета на сперматозоидите в криоконсервирана говежда семенна течност.** Субстанциите бяха разтворени в следните концентрации – 3.6  $\mu\text{mol/l}$  и 7.2  $\mu\text{mol/l}$ . В така избраните концентрации не се наблюдава токсично въздействие на изследваните вещества върху сперматозоидите. След разреждане на семенната течност с хранителни среди, в които бяха предварително разтворени изследваните вещества, те се инкубираха при температура 38°C и резултатите се отчитаха на всеки 60 минути. Следва да се отбележи, че след 1 h инкубация се наблюдава значително повишаване на подвижността на сперматозоидите във всички проби. Това най-вероятно се дължи на факта, че семенната течност се разрежда с комплексна среда, която съдържа важни хранителни вещества. По този начин се засилва обмяната на веществата в сперматозоидите, което осигурява необходимата им за движение енергия. След 1 h и 30 min инкубация се наблюдава тенденция към увеличаване на мотилитета на сперматозоидите в пробите, съдържащи субстанции VZ1 и VZ4 в концентрация 7.2  $\mu\text{mol/l}$ . Наблюдава



Таблица 2. Влияние на метилксантини - VZ1,VZ4,VZ5, Етоксифилин, Пентоксифилин в концентрации 3.6  $\mu\text{mol/l}$  и 7.2  $\mu\text{mol/l}$  разтворени в натриев цитрат върху мотилитета на сперматозонидите

Table 2.Effect of methylxanthines –VZ1, VZ4, VZ5, Etoxifylline, Pentoxifylline in concentrations 3.6  $\mu\text{mol/l}$  and 7.2  $\mu\text{mol/l}$  dissolved in Sodium citrate on the motility of sperm

	Натриев цитрат Sodium citrate	VZ1		VZ4		VZ5		Етоксифилин Etoxifylline		Пентоксифилин Pentoxifylline	
		3.6	7.2	3.6	7.2	3.6	7.2	3.6	7.2	3.6	7.2
концентрация concentration $\mu\text{mol/l}$		3.6	7.2	3.6	7.2	3.6	7.2	3.6	7.2	3.6	7.2
веднага immediately	добра good	добра good	добра good	мн.добра very good	мн.добра very good	мн.добра very good	мн.добра very good	добра good	добра good	мн.добра very good	мн.добра very good
1h 1hour	добра good	добра good	добра good	добра good	мн.добра very good	добра good	мн.добра very good	добра good	добра good	добра good	добра good
2 h 2 hours	умрели dead	умрели dead	слаба low	слаба low	добра good	слаба low	слаба low	умрели dead	слаба low	слаба low	слаба low
3 h 3 hours	умрели dead	умрели dead	умрели dead	умрели dead	единични. трепкат на място single motile	умрели dead	единични. трепкат на място single motile	умрели dead	умрели dead	умрели dead	единични. трепкат на място single motile

се и добра преживяемост на сперматозоидите в тази концентрация. В другите проби мотилитетът на сперматозоидите е също увеличен, но е много по-слаб спрямо посочените по-горе субстанции, като същевременно се наблюдава значително намаляване на броя на живите сперматозоиди и при двата вида концентрации. След 2 h и 30 min инкубиране в почти всички проби се наблюдава умиране на сперматозидите, с изключение на пробите с концентрация 7.2  $\mu\text{mol/l}$  на VZ4. В нея се наблюдават единични живи сперматозоиди, трепкащи на място. Според **Куцарова и кол.** (1997) при стимулация с пентоксифилин на криоконсервирана семенна течност се наблюдава дозозависим ефект. Получените от нас резултати също потвърждават този факт, че при концентрации 7.2  $\mu\text{mol/l}$  на изследваните вещества се повишава значително мотилитетът на сперматозоидите спрямо същите субстанции, но в концентрация 3.6  $\mu\text{mol/l}$ . (табл. 2)

Най-вероятно това се дължи на факта, че при размразяване вътреклетъчната концентрация на ц.АМФ е с около 3 пъти по-ниска в сравнение с концентрацията му в сперматозоидите преди замразяване. При добавяне на инхибитори на ц.АМФ зависима фосфодиестераза в по-високи концентрации, те благоприятстват за по-бързото увеличаване на нивата на ц. АМФ. При двете използвани от нас концентрации статистически значими разлики между отделните проби се наблюдават след около 1 h и 30 min инкубация.

#### ИЗВОДИ

Пентоксифилин, етоксифилин, VZ1, VZ3, VZ4, VZ5 в концентрации 3.6  $\mu\text{mol/l}$  и 7.2  $\mu\text{mol/l}$  увеличават мотилитета и преживяемостта на сперматозоидите спрямо контролните проби, съдържащи размразена криоконсервирана говежда семенна течност, разредена в двата вида хранителни среди - натриев цитрат и ТСМ-199.

Наблюдава се дозозависим ефект на изследваните метилксантини в криоконсервирана говежда семенна течност, като най-добри ре-

зултати се получават в концентрация - 7.2  $\mu\text{mol/l}$ .

От изследваните вещества най-добри резултати се получават при субстанцииите – VZ1 и VZ4 в концентрация 7.2  $\mu\text{mol/l}$ , като най-силно се наблюдава повишаване на мотилитета на сперматозидите в рамките на 1 h и 30 min до 2 h.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Guraya, S.**, 1987. Biology of spermatogenesis and spermatozoa in Mammals. Springer-Verlag. Berlin.
2. **Gardner, D., Weissman, A., Howles, C. M., Shohan, Z.**, 2002. Textbook of Assisted Reproductive Techniques – Laboratory and Clinical Perspectives. Martin Dunitz. 732.
3. **Fauser, M.**, 2003. Reproductive Medicine - Molecular, Cellular and genetic Fundamentals. Parthenon Publishing. 695.
4. **Наков, Р.**, 1987. Влияние на някои адренергични вещества и метилксантини върху подвижността на човешки сперматозоиди. Автореферат на дисертация за присъждане на научна степен к.б.н. София.
5. **Tournaye, H., Janssens, R.**, 1994. The influence of pentoxifylline on motility and viability of spermatozoa from normozoospermic semen samples. International journal of andrology, 17: 1-8.
6. **Essayan, D. M.**, 2001. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 108 (5) 671-680.
7. **Daly, J. W., Jacobson, K. A., Ukena, D.**, 1987. Adenosine receptors: development of selective agonists and antagonists. Progress in Clinical and Biological Research. 230 (1): 41-63.
8. **Deree, J., Martins, J. O., Melbostad, H., Loomis, W. H., Coimbra, R.**, 2008. Insights into the regulation of TNF-alpha production in human mononuclear cells: the effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. Clinics (Sao Paulo). 63 (3): 321-8.
9. **Marques, L. J., Zheng, L., Poulakis, N., Guzman, J., Costabel, U.**, 1999, February. "Pen-

- toxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages". Am. J. Respir. Crit. Care Med. 159 (2): 508–11.
10. **Sharma, R., Tolentino, T., Thomas, A., Agarwal, A.**, 1996. Optimal dose and duration of exposure to artificial stimulants in criopreserved human spermatozoa, J-Urol. 2: 568-573.
11. **Koutsarova, N., Todorov, P., Koutsarov, G.**, 1997. Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa., Jorنال of Reproduction and Fertility Supplement 51: 117-121.

## EFFECT OF PENTOXIFYLLINE AND NEWLY SYNTHESIZED ORIGINAL METHYLXANTHINES ON FUNCTIONAL PARAMETERS OF ANIMAL SEMEN

*P. Petrov. T. Todorova. P. Todorov\*. I. Todorov*

*Institute of Animal Science-Kostinbrod*

*\* Institute of Biology and Immunology of Reproduction-BAS, Sofia*

During cryopreservation a substantial reduction of motility and survival rates of spermatozoa is observed. This makes the issue of seeking effective stimulators of motility of the sperm very prospective. Big expectations in this regard are assigned to substances from the group of methylxanthines.

The purpose of this study is to establish what is the impact of pentoxifylline and some original methylxanthines on motility of cryopreserved spermatozoa in order to establish the possibility for their practical use in the technology for artificial insemination of farm animals.

In an experiment, methylxanthines - VZ1. VZ4. VZ5., etoxifylline and pentoxyfiline. were used in concentrations – 3.6  $\mu\text{mol/l}$  and 7.2  $\mu\text{mol/l}$  dissolved in culture media - medium 199. sodium citrate. DMEM F-12. After thawing and subsequent dilution in mediums containing the methylxanthines to be tested they were incubated at 38°C and checked every 60 min. The newly synthesized methylxanthines designated VZ1 et VZ4 in concentration of 7.2  $\mu\text{mol/l}$  showed the best results especially in the first hour or two.