

BIOLOGICZNE WŁAŚCIWOŚCI NASIENIA BUHAJA  
W ZALEŻNOŚCI OD ENDOGENNEGO I EGZOGENNEGO GLUTATIONU (GSH)

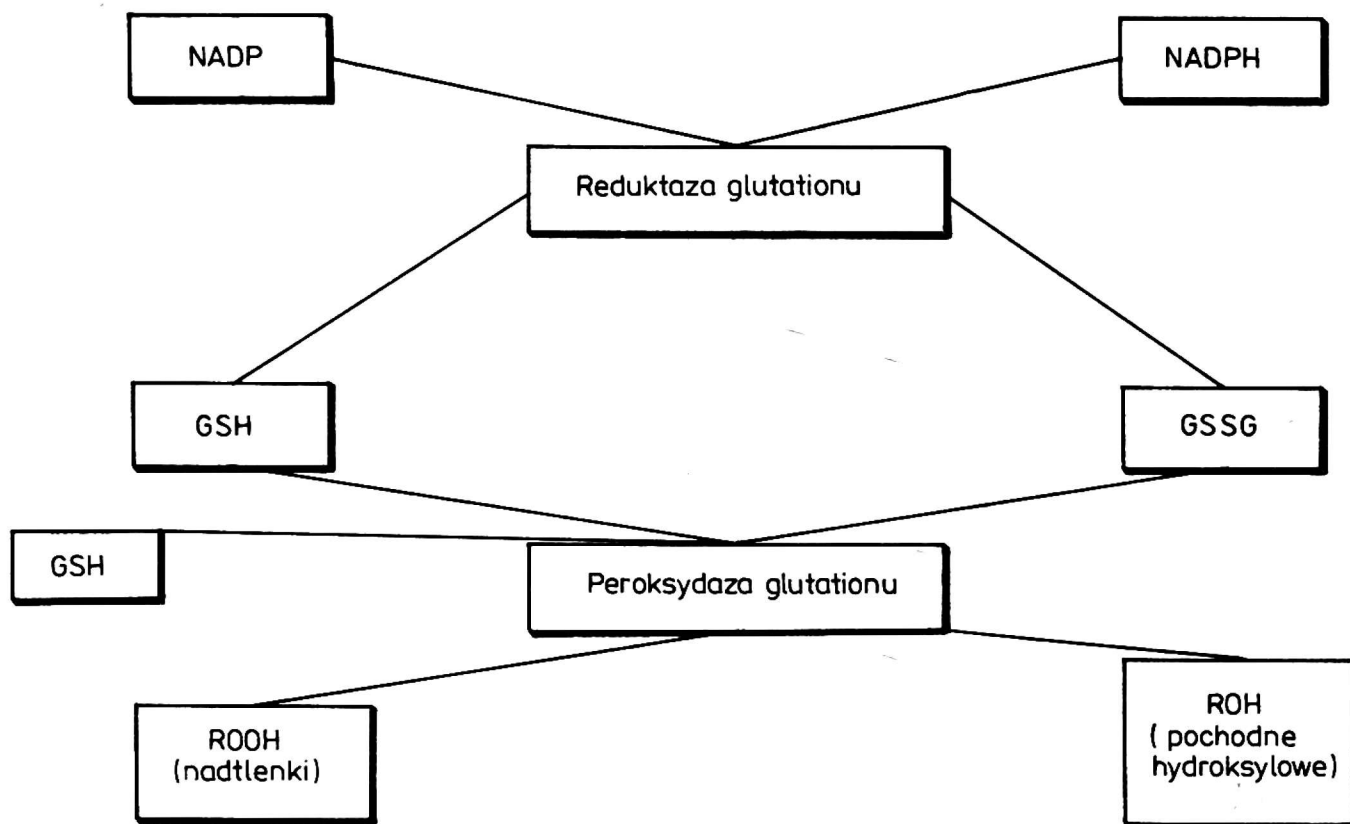
Roman Sławeta

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Glutation ( $\gamma$ -glutamilo-cysteilo-glicyna) jest związkem szeroko rozpowszechnionym w organizmach żywych. Występuje on głównie w formie zredukowanej (GSH) i tylko w niewielkiej ilości w postaci utlenionej (GS-SG) [14, 37]. Rola metaboliczna glutationu (GSH) związana jest z udziałem tego związku w procesach oksydoredukcyjnych [13], transporcie aminokwasów przez błony komórkowe [26], regulacji aktywności enzymatycznej [38], jest on także kofaktorem kilku enzymów [1]. Udział GSH wykazany jest również w stabilizacji prawidłowej struktury błon komórkowych [19]. Ponadto, jako substrat peroksydazy glutationu w systemie enzymatycznym peroksydaza-reduktaza, bierze udział w rozkładzie nadtlenu wodoru i lipidów [9, 10]. Schemat cyklu glutationowego ilustruje rysunek 1.

Zawartość glutationu w nasieniu ssaków jest różna. I tak, w plemnikach tryka, psa, kozła, człowieka wynosi odpowiednio: 9, 13, 19, 20 nmoli/ $10^9$  plemników, zaś średni poziom w plazmie nasienia wymienionych gatunków wynosi 2  $\mu$ M na 1  $\mu$ l [20]. W przypadku nasienia buhaja plemniki zawierają 28 nmoli/ $10^9$  ple-

mników, zaś plazma 26  $\mu\text{M}$  na 1  $\mu\text{l}$  [33]. Wysoki poziom GSH obserwowano w plemnikach myszy - 37 nmoli/ $10^9$  plemników [3]. Nie wykazano natomiast obecności tego peptydu w nasieniu kura i królika [2, 20].



Rys. 1. Schemat cyklu glutationowego

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że poziom GSH zarówno w plemnikach, jak i plazmie nasienia buhaja zmienia się w zależności od pory roku. Najwyższy poziom GSH w plemnikach stwierdzono w ejakulatach pozyskanych w okresie jesieni i zimy. Jednocześnie w wymienionych porach roku obserwowano wyższą aktywność aminotransferazy asparaginianowej w środowisku zewnątrzkomórkowym oraz wyższy w stosunku do pozostałych pór roku odsetek akrosomów zmienionych. Okres wiosenno-letni charakteryzo-

wał się niższym poziomem GSH komórkowego, przy jego stosunkowo wysokim poziomie w plazmie nasienia, z czym związane było zmniejszone uwalnianie się aminotransferazy asparaginianowej i niższy odsetek akrosomów zmienionych [34]. Ponadto, obserwowano istotną dodatnią zależność między poziomem glutationu w plemnikach a aktywnością aminotransferazy asparaginianowej w plazmie nasienia. Wskazuje to, że wysoki poziom endogennego GSH w plemnikach powoduje zaburzenia w obrębie części wstawkowej, przejawiające się intensywniejszym uwalnianiem do plazmy nasienia aminotransferazy asparaginianowej, białka enzymatycznego, odpowiedzialnego za metabolizm komórkowy i zlokalizowanego we wstawce plemnika [11]. W odniesieniu do zawartości endogennego GSH w plazmie nasienia wykazano istotną ujemną korelację między zewnątrzkomórkowym GSH a aktywnością aminotransferazy asparaginianowej w plazmie nasienia. Sugeruje to, że w ejakulatach o wysokim stężeniu GSH w plazmie nasienia należy spodziewać się zmniejszonego uwalniania aminotransferazy asparaginianowej z plemników [34]. Powyższa sugestia może mieć związek z lokalizacją peroksydazy glutationu w nasieniu buhaja. Enzym ten bowiem stwierdzono tylko w plazmie nasienia [6, 8, 36], dlatego też ma ona własności hamujące peroksydację lipidów. In vitro jest czynnikiem antyspermicydalnym wobec egzogennych nadtlenuków lipidów [16]. Przy braku katalazy w nasieniu buhaja [22] wydaje się, że enzymem regulującym poziom nadtlenuków jest peroksydaza glutationu i współpracująca z nią specyficzna reduktaza glutationu. Inni autorzy wykazali brak aktywności peroksydazy i reduktazy glutationu w nasieniu tryka i psa, aczkolwiek stwierdzono wysoką aktywność wymienionych

białek enzymatycznych w plemnikach [20]. Obserwowane różnice gatunkowe mają związek z występowaniem GSH, bowiem w nasieniu królika, w którym nie stwierdzono aktywności peroksydazy glutationu, enzymem hamującym peroksydację lipidów jest dysmutaza ponadnadtlenkowa [3].

Plemniki buhaja w warunkach aerobowych ulegają szybkiemu procesowi starzenia się, przejawiającego się obniżeniem funkcji metabolicznych, takich jak fruktoliza i oddychanie [23]. Spowodowane jest to tym, że w obecności tlenu oddychanie plemników nie opiera się wyłącznie na substratach pozakomórkowych, jak np. oksydacyjnym usuwaniu produktów fruktolizy, głównie kwasu mlekowego, lecz także występuje zjawisko polegające na utlenianiu składników samej komórki, głównie lipidów [24]. W wyniku peroksydacji lipidów membran komórkowych dochodzi do nagromadzenia się spermicydalnych nadtlenków lipidów [15, 17, 18], które powodują zaburzenia biochemiczne, dotyczące aktywności oddechowej plemników, fruktolizy i syntezy ATP [5, 25]. Ponadto, w procesie konserwacji plemników buhaja średnio około 30% komórek ulega destrukcji, w wyniku czego dochodzi do uwalniania z plemników oksydazy L-aminokwasów [27]. Enzym ten katalizuje reakcję utleniania L-tyrozyny, L-fenylalaniny oraz L-tryptofanu, zawartych w nasieniu buhaja oraz żółtku jaja kurzego, stanowiącego komponent rozrzedzalnika do konserwacji plemników [28]. Jednym z końcowych produktów tej przemiany jest  $H_2O_2$  [29]. Przeprowadzona analiza poziomu nadtlenków lipidów w nasieniu buhaja, poddanemu konserwacji i przechowywanemu w ciekłym azocie, wykazała około 8-krotny ich wzrost w stosunku do nasienia świeżego [21].

Badania przeprowadzone nad wpływem egzogennych wolnych grup tiolowych, obecnych w nasieniu konserwowanym w niskich temperaturach, wykazały, że związki te zwiększają liczbę plemników o ruchu postępowym [12, 30, 32]. Obserwowano także, że egzogeny glutation (GSH) wpływa na natężenie fruktolizy rozmrożonego nasienia buhaja, mierzonej ilością powstającego mleczanu, która jest o około dwukrotnie wyższa w próbach nasienia z GSH w stosunku do nasienia bez GSH [33].

Wskaźnik fruktolizy jest wykorzystywany do oceny jakości nasienia, stwierdzono bowiem istnienie dodatniej korelacji między natężeniem beztlenowej fruktolizy a stopniem ruchliwości plemników buhaja i tryka [22]. Jednocześnie substancje, które hamują ruchliwość plemników, wpływają podobnie na natężenie fruktolizy i produkcję kwasu mlekowego [25]. Obserwowano także, że zarówno ruchliwość, jak i fruktoliza plemników ssaków, ulegają zahamowaniu przez szereg ciał reagujących z tiolami, na przykład z jonami miedziowymi, nadtlenkiem wodoru i o-jodobenzoesanem. Natomiast dodanie GSH zapobiega hamującemu działaniu wyżej wymienionych związków [22].

Przeprowadzony pomiar zużycia tlenu przez plemniki rozmrożonego nasienia buhaja w obecności  $10^{-4}$ M 2,4-dwunitrofenolu, związku zwiększającego dwukrotnie lub więcej oddychanie mitochondrium plemników buhaja, wykazał, że egzogeny GSH o stężeniu 5 mM nie wpływa na szybkość oddychania, natomiast tempo oddychania różniło się istotnie w różnych porach roku [35]. Stwierdzona również sezonowa zmienność może mieć związek z uszkodzeniami kriogenicznymi, zachodzącymi we wstawce plemników i wpływającymi na tempo tlenowych przemian [39] lub też

mogą być związane z obecnością w plazmie nasienia niskocząsteczkowych związków, które przechodząc do plemników zwiększają ich oddychanie, jak obserwowano w przypadku nasienia drobiu [4].

Strukturami komórkowymi plemników, szczególnie podatnymi na proces peroksydacji, jest akrosom i plazmolemma [18]. Egzogeny glutation (GSH) nie wpływa na stan struktur morfologicznych akrosomu plemników nasienia bezpośrednio po rozmrożeniu, aczkolwiek zwiększa liczbę komórek z akrosomem nie zmienionym w nasieniu poddanym 3-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C [35]. Ponadto w nasieniu bezpośrednio po rozmrożeniu GSH zmniejsza przepuszczalność błon plemnikowych, czego dowodem jest obserwowana mniejsza aktywność aminotransferazy asparagianowej w plazmie rozmrożonego nasienia buhaja w stosunku do prób bez GSH [35].

Obserwacje przeprowadzone nad wpływem egzogenego GSH na wartość biologiczną nasienia buhaja dowiodły, że peptyd ten w sposób istotny zwiększa liczbę krów cielných [35]. Należy wspomnieć, że już w 1956 r. Bortoff [7] wykazał wzrost wartości biologicznej nasienia zawierającego egzogeny GSH.

#### LITERATURA

1. Agar N. S., Smith J. E.: Effect of copper on red cell glutathione sheep. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1973, 142, 502-505.
2. Alvarez J. G., Storey B. T.: Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. Biol. Reprod. 1982, 27, 1102-1108.

3. Alvarez J. G., Storey B. T.: Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1984, 30, 323-331.
4. Ashizawa K., Okauchi K.: Stimulation of sperm motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by a low molecular weight fraction of seminal plasma. *J. Reprod. Fert.* 1984, 71, 593-598.
5. Bar-Sagie O., Mayevsky A., Bortov B.: Effects of hyperbaric oxygenation on spermatozoa motility driven by mitochondrial respiration. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ Exercise Physiol.* 1981, 50, 531-537.
6. Bartle J. L., Senger P. L.: Glutathione peroxidase and semen quality. *J. Anim. Sci. Suppl.* 1, 1980, 51, 258.
7. Bortoff A.: The effect of glutathione on the fertilizing capacity of frozen bovine spermatozoa. *The Anat. Rec.* 1956, 3, 631-632.
8. Brown D. V., Senger P. L., Stone L. S., Froseth J. A., Becker W. C.: Glutathione peroxidase in bovine semen. *J. Reprod. Fert.* 1977, 50, 117-118.
9. Burk R. F.: Protection by GSH against lipid peroxidation induced by ascorbate and iron rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 1982, 31, 601-602.
10. Chance B., Sies H., Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979, 59, 527-605.
11. Graham E. F., Pace M.: Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. *Cryobiology* 1967, 4, 75-84.
12. Gupta H. P., Tripathi S. S.: Comparative study of different room temperature dilutors of buffalo semen. *Indian J. Anim. Sci.* 1983, 53, 756-758.
13. Jaffe E.: Hereditary hemolytic disorders and enzymatic deficiencies of human erythrocytes. *Blood*, 1970, 25, 116-134.
14. Jocelyn P. C.: *Biochemistry of the SH group.* Academic Press, New York, 1972.
15. Jones R., Mann T.: Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proc. R. Soc. B* 1973, 184, 103-107.
16. Jones R., Mann T.: Lipid peroxidation in spermatozoa, for-

- mation, role of plasmalogen and physiological significance. *Proc. R. Soc. B* 1976, 193, 317-333.
17. Jones R., Mann T.: Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1977, 50, 255-260.
  18. Jones R., Mann T.: Damage to spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fert.* 1977, 50, 261-268.
  19. Kosower N. S., Kosower E. M.: Protection of membranes by glutathione. In *Glutathione* Eds. L. Flohe, H. Ch. Wendel. Academic Press, New York 1974, 216-226.
  20. Li, Ting-Kai.: The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 1975, 12, 641-646.
  21. Luberda Z., Strzeżek J.: Poziom nadtlenków lipidów jako wskaźnik tempa procesów starzeniowych plemników przechowywanych w ciekłym azocie. *Mat. XXI Zjazdu PTB Kraków 26-28 IX 1985 s. 181.*
  22. Mann T.: *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* Methuen, London 1964.
  23. Mann T., Lutwak-Mann C.: Biochemical aspects of aging in spermatozoa in relation to motility of fertilizing ability. In: *Aging Gametes*, ed. by R. J. Blandau, Basel, 1975, 122-150.
  24. Mann T., Jones R., Sherins R.: Oxygen damage, lipid peroxidation and motility of spermatozoa. In *Testicular Development, Structure and Function*, ed. by A. Steinberger and E. Steinberger. New York 1980, 497-501.
  25. Mann T., Lutwak-Mann C.: *Male Reproductive Function and Semen.* Springer Verlag, Berlin 1981.
  26. Meister A.: On the enzymology of amino acid transport. *Science* 1973, 180, 33-39.
  27. Shannon P., Curson B.: Toxic effect and mode of action of dead sperm on diluted bovine semen. *J. Dairy Sci.* 1972, 55, 614-620.
  28. Shannon P., Curson B.: Kinetics of the aromatic L-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa of diluted bovine



- semen stored at 5°C and ambient temperatures. *J. Reprod. Fert.* 1982, 64, 463-467.
29. Shannon P., Curson B.: Effects of cysteine and EDTA on in vitro survival at 37°C and fertility of diluted bovine semen. *N. Z. J. Agric. Sci.* 1983, 26, 85-88.
  30. Shannon P., Curson B., Pitt C. J., Lai K. C.: Effects of various fraction of egg yolk, BSA, and ovoalbumin on sperm motility and effect of storage on restoration of motility. *N. Z. J. Agric. Res.* 1983, 26, 297-302.
  31. Sławeta L.: Wpływ dodatku glutationu zredukowanego i cysteiny do nasienia mrożonego na jego zdolność zapłodniającą. *Medycyna Wet.* 1973, 29, 11-12.
  32. Sławeta R., Wiechetek M., Laskowska-Klita T.: Wpływ egzogenego glutationu (GSH) na zawartość mleczanu w nasieniu buhaja rasy czarno-białej. *Mat. XXI Zjazdu PTB Kraków 25-27 IX 1985.* s. 337.
  33. Sławeta R., Laskowska-Klita T.: Zawartość glutationu w nasieniu buhaja rasy c.b., *Acta Physiol. Pol.* 1985, 2 (w druku).
  34. Sławeta R., Laskowska-Klita T., Sosińska G.: Właściwości biologiczne nasienia buhaja w zależności od poziomu endogenego glutationu (GSH). *Medycyna Wet.* (w druku).
  35. Sławeta R.: Wpływ egzogenego glutationu (GSH) na właściwości biologiczne rozmrożonego nasienia buhaja. *Animal Reprod. Sci.* (wysłane do druku).
  36. Smith D. G., Senger P. L., McCutchan J. F., Landa C. A.: Selenium and glutathione peroxidase distribution in bovine semen and selenium -75 retention by the tissues of the reproductive tract in the bull. *Biol. Reprod.* 1979, 20, 377-383.
  37. Srivastava S., Beutler E.: The transport of oxidised glutathione from the erythrocytes of various species in the presence of chromate. *Biochem. J.* 1969, 114, 833-837.
  38. Srivastava S.: Methabolism of red cell glutathione. *Exp. Eye Res.* 1971, 11, 294-305.
  39. Strzeżek J., Torska J., Al-Taha J., Głogowski J.: Biochemical methods could help improve bull semen freezing. *Pract. Biotechnology.* 1981, 8, 14-19.

Roman Ślaweta

BIOLOGICAL PROPERTIES OF BULL SEMEN IN RELATION  
TO ENDOGENOUS AND EXOGENOUS GLUTATHIONE (GSH)

S u m m a r y

Bull semen contain glutathione (GSH). In  $10^9$  spermatozoa of bull, the concentration of GSH is 28 nmoles and in seminal plasma 26  $\mu\text{M}/1\mu\text{l}$ . Bull sperm GSH content is higher than those reported for other mammalian sperm which contain GSH, except mouse. The high level of GSH in seminal plasma may be related to GSH-Px activity which is associated with the seminal plasma and not spermatozoa. It was found that there are significant positive correlations between GSH level in spermatozoa and abnormal acrosomes and also AspAT „leakage” from spermatozoa, significant negative correlation between GSH level in seminal plasma and release AspAT as well as the percentage of abnormal acrosomes. Season of the year influenced significantly contents of GSH in spermatozoa and seminal plasma.

Addition of GSH to the frozen bull semen caused increase of the percentage progressive sperm motility and the rate of lactic acid production. Furthermore it caused decrease of plasma membrane permeability to AspAT and the number of spermatozoa with the normal apical ridge of acrosome after incubation for 3 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . Exogenous GSH caused also the in-

crease of the fertilizing capacity of frozen bovine spermatozoa. There was no difference in the rate of oxygen uptake after treatment of the semen with exogenous GSH and without it.

Роман Славета

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СЕМЕНИ БЫКА В ЗАВИСИМОСТИ  
ОТ ЭНДОГЕННОГО И ЭКЗОГЕННОГО ГЛЮТАТИОНА (GSH)

Р е з ю м е

Констатировано наличие эндогенного глутатиона (GSH) в семени быка. Уровень GSH в сперматозоидах составляет  $28 \text{ нмол}/10^9$  сперматозоидов, а в плазме семени  $26 \text{ мМ}/\text{мл}$ . Он выше наблюдаемого в семени других млекопитающих, кроме семени мыши. Высокий уровень GSH в плазме семени быка может быть связан с констатированной другими авторами высокой активностью пероксидазы глутатиона (GSH - P<sub>x</sub>). Доказано существенные, хотя низкие, положительные коэффициенты корреляции между концентрацией GSH в сперматозоидах и морфологическим состоянием акросомы и истечением аспарагиниановой аминотрансферазы (AspAT) из сперматозоидов, а также отрицательные между уровнем GSH в плазме семени и приведенными показателями качества семени. Кроме того, существенным образом влияло время года на уровень GSH, как в сперматозоидах, так и в плазме семени быка.

Экзогенный GSH увеличивает число сперматозоидов с поступательным движением и количество образующегося лактата в размноженном семени быка. Кроме того, он стабилизирует плазмолемму сперматозоида, доказательством чего является меньшая активность аспарагиниановой аминотрансферазы, наблюдаемой во внеклеточной среде.

GSH увеличивает тоже число сперматозоидов с неповрежденными акросомами в семени инкубированном в течение 3 часов в температуре  $37^{\circ}\text{C}$ , а также повышает биологическую ценность размороженного семени быка. Не были доказаны различия относительно скорости дыхания митохондрия сперматозоидов, консервированных без и с GSH.