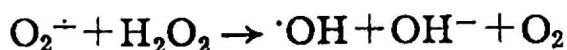


ZOFIA LUBERDA, JERZY STRZEZEK  
*Akademia Rolniczo-Techniczna im. M. Oczapowskiego w Olsztynie*

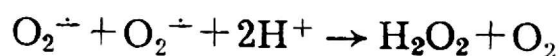
## WYBRANE ASPEKTY PEROKSYDACJI LIPIDÓW W NASIENIU

Toksyczny wpływ tlenu na męskie komórki rozrodcze odnotowano już 40 lat temu [37]. Obecnie przyjmuje się, że szkodliwe działanie tlenu jest następstwem wytwarzania w komórkach pośrednich produktów jego redukcji. Do całkowitego zredukowania cząsteczki  $O_2$  potrzebne są 4 elektrony. Reakcje te są wielostopniowe a metabolitami pośrednimi są związki o charakterze wolnych rodników. Produktem jednoelektronowej redukcji  $O_2$  jest rodniko-jon ponadtlenkowy  $O_2^{\cdot-}$ . Rodniko-jon ponadtlenkowy jest produktem końcowym lub pośrednim wielu reakcji enzymatycznych i procesów autooksydacji szeregu grup i związków organicznych. Można go otrzymać między innymi w reakcjach utleniania zredukowanych flawoprotein [46, 60] i chinonów [43]. Uważa się, że szkodliwe działanie  $O_2^{\cdot-}$  można sprowadzić do takich procesów jak: peroksydacje kwasów tłuszczowych, depolimeryzacja wielocukrów [20] i kwasów nukleinowych oraz utlenianie grup sulfhydrylowych białek [10]. Pleiffer i McCoy [50] wykazali współzależność między wytwarzaniem rodniko-jonów  $O_2^{\cdot-}$  w reakcji enzymatycznego utleniania zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) a peroksydacją nienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów błon erytrocytów, mitochondriów i lizosomów. Kro-Lang Fong i wsp. [30] stwierdzili natomiast, że w procesie peroksydacji lipidów błon lizosomów nie biorą udziału bezpośrednio rodniko-jony ponadtlenkowe, lecz rodniki hydroksylowe ( $\cdot OH$ ). Wytwarzanie rodnika  $\cdot OH$  zachodzi podczas reakcji Habera i Weissa (reakcja 1).



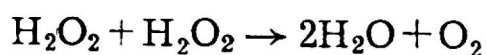
Reakcja 1: Wytwarzanie rodnika  $\cdot OH$  w reakcji Habera i Weissa [18].

Niwelowanie rodniko-jonów  $O_2^{\cdot-}$  w żywych komórkach odbywa się przy udziale enzymu zwanego dysmutazą ponadtlenkową [39]. W pracach poświęconych dysmutazie ponadtlenkowej często używa się skrótu pochodzącego od jej angielskiej nazwy superoxide dismutase — SOD. Enzym ten należy do klasy oksydoreduktaz o nazwie systematycznej: — oksydoreduktaza ponadtlenek:ponadtlenek (EC 1. 18. 1.1.) i katalizuje dysmutację rodniko-jonów  $O_2^{\cdot-}$  (reakcja 2).



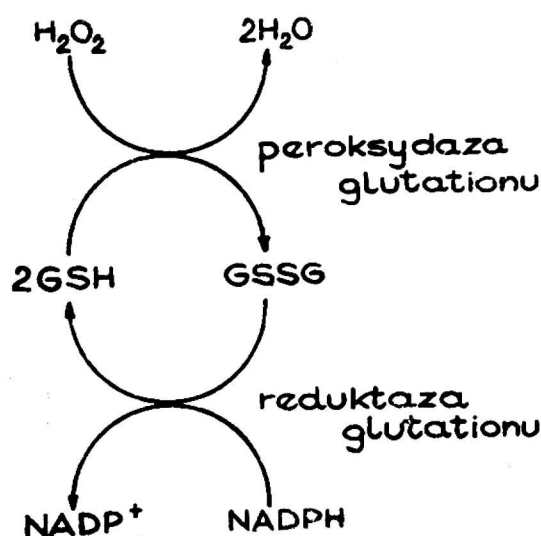
Reakcja 2. Reakcja dysmutacji jonów ponadtlenkowych katalizowana przez dysmutazę ponadtlenkową [42].

Funkcję ochronną pełni również katalaza (reakcja 3), która redukuje nadtlenek wodoru, będący substratem reakcji Habera i Weissa oraz enzymy cyklu glutationowego (rys. 1).



Reakcja 3. Rozkład  $\text{H}_2\text{O}_2$  przez katalazę.

W cyklu glutationowym zredukowany glutation (GSH) pod wpływem peroksydazy glutationowej jest utleniany do GSSG z równoczesną redukcją nadtlenków. Utleniony glutation (GSSG) jest substratem reduk-



Rys. 1. Redukcja nadtlenku wodoru w cyklu glutationowym (9)

tazy glutationowej wymagającej obecności  $\text{NADPH}$  jako koenzymu. W nasieniu funkcjonują wszystkie wymienione wyżej enzymatyczne systemy detoksykacji tlenu. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wykazują plemniki i plazma nasienia knura, królika, ogiera, osła, tryka, buhaja i człowieka [3, 23, 41].

Dysmutaza ponadtlenkowa plemników buhaja występuje w postaci dwóch izoenzymów [36]. Lżejszy izoenzym jest miedziowo-cynkową proteiną. Izoenzym cytozolowy plemników knura jest również białkiem zawierającym miedź i cynk [41].

Wysoką aktywność peroksydazy glutationowej stwierdzono w nasieniu buhaja [7, 29, 55]. W plazmie nasienia buhaja peroksydaza glutatio-

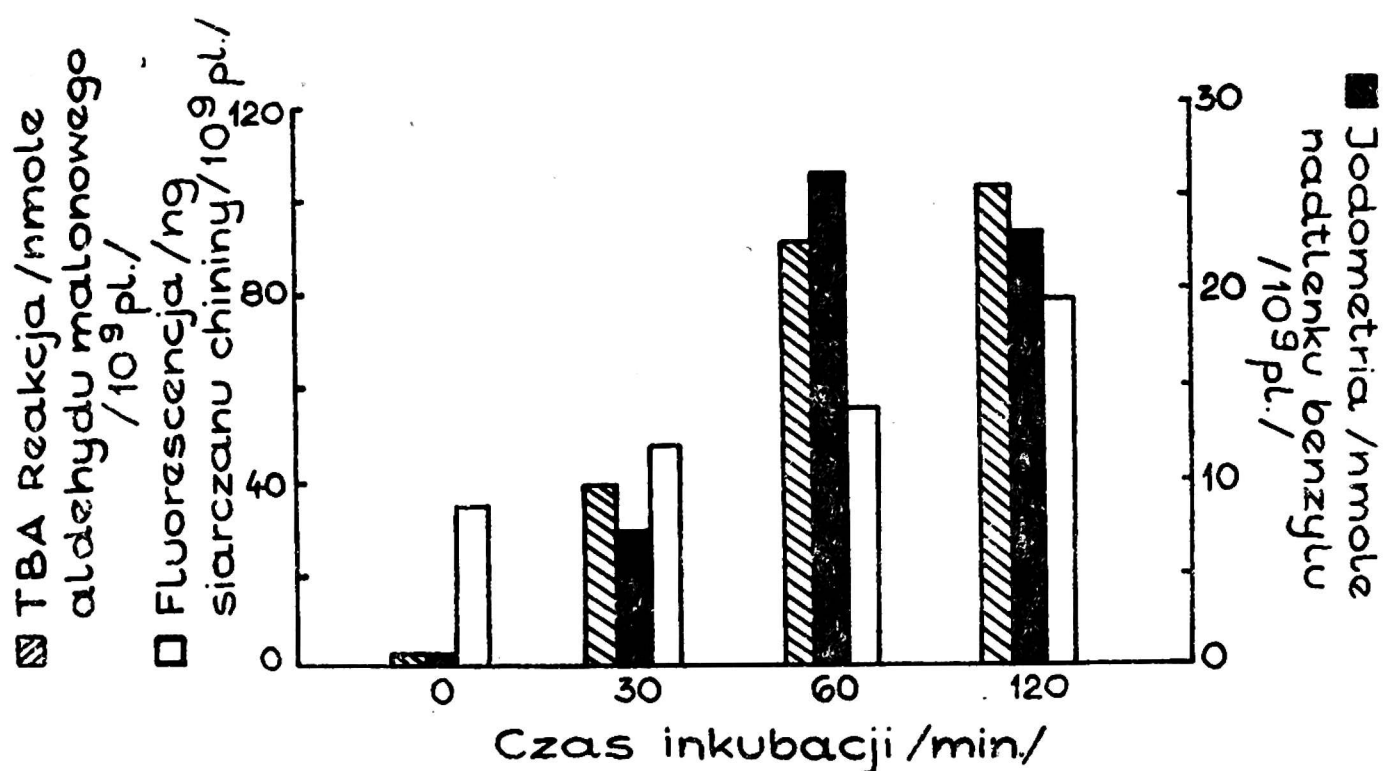
nowa (GSH-Px) występuje w dwóch formach molekularnych [29]. Obie formy molekularne enzymu zawierają selen. Są wrażliwe na metale ciężkie (Cd, Cu, Hg, Pb) i niektóre dwuwartościowe jony innych metali (Co, Fe, Mg, Mn, Ni, Zn). Optimum pH dla obu form GSH-Px wynosi 7,0. Selenozależna peroksydaza glutationowa plazmy nasienia buhaja wykazuje właściwości charakterystyczne dla GSH-Px hydronadtlenków fosfolipidów i pełni ważną funkcję w ochronie plemników przed szkodliwym działaniem procesów peroksydacji. Aktywność peroksydazy glutationowej wykryto również w nasieniu człowieka, psa, kozła i tryka [32]. Nie stwierdza się aktywności tego enzymu w nasieniu knura i tylko śladową w ejakulatach królika [32]. W nasieniu myszy cykl glutationowy skutecznie chroni plemniki przed działaniem endogennych nadtlenków lipidów [5]. Funkcję ochronną przed peroksydacją mogą pełnić również takie związki jak witaminy A, E, C, a także zredukowany glutation [8] czy karoten [15]. Zawartość zredukowanego glutationu w nasieniu jest różna. Alvarez i Storey [4, 5] nie stwierdzili obecności glutationu w nasieniu królika. Peptyd ten natomiast występuje w nasieniu człowieka, kozła, psa oraz tryka [32].

Peroksydacji towarzyszy obniżenie poziomu fosfolipidów. Analiza fosforu lipidowego i ekstrahowanych lipidów (chromatografia cienkowarstwowa i gazowo-cieczowa) wykazała, że po jednej godzinie peroksydacji plemniki tracą około 2/3 fosforu lipidowego oraz połowę zawartości plazmalogenów i większość nienasyconych kwasów tłuszczowych [38]. W największej ilości peroksydatywnemu rozszczepieniu ulega kwas dokozaheksaenowy (C<sub>22:6</sub>) i kwas arachidonowy (C<sub>20:4</sub>). Nadtlenki lipidów w plemnikach buhaja pochodzą całkowicie z frakcji lipidowej tych komórek [11]. Autokatalityczny proces peroksydacji ulega znacznemu przyspieszeniu w obecności askorbinianu sodu i katalitycznych ilości niektórych kationów metali jak: Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> czy Cu<sup>2+</sup> [49, 62]. W celach doświadczalnych peroksydację endogennych lipidów można indukować przez inkubację przemytych plemników w warunkach tlenowych w obecności katalitycznych ilości jonów żelazawych i askorbinianu sodu [11, 19, 58]. Szybkość peroksydacji nienasyconych lipidów można mierzyć ilościowo przy pomocy reakcji z kwasem triobarbiturowym, jodometrycznie lub fluorometrycznie (rys. 2). W praktyce laboratoryjnej najczęściej szybkość peroksydacji lipidów mierzy się ilością utworzonego aldehydu malonowego poprzez reakcję z kwasem tiobarbiturowym [58].

#### *Wpływ peroksydacji lipidów na struktury morfologiczne plemników*

Produkty peroksydacji lipidów naruszają strukturę morfologiczną plemników [26, 27, 53]. Po godzinie inkubacji z askorbinianem sodu

(0,5mM) i siarczanem żelazawym (0,5mM) 97% plemników tryka wybarwia się eozyną, a u 55% plemników stwierdza się różne uszkodzenia akrosomu (tab. 1). Z komórek plemnikowych następuje wyciek enzymów (tab. 2). Najintensywniejszy wyciek z peroksydowanych plemników notuje się dla aminotransferazy asparaginianowej. Następuje również wzmożone uwalnianie akrosyny z akrosomu [53]. W mniejszej ilości wydostają się na zewnątrz komórki inne enzymy hydrolityczne związane z akrosomem (tab. 2). Badania ultrastrukturalne wykazały, że peroksydacja endogen-



Rys. 2. Przebieg reakcji peroksydacji mierzony poprzez reakcję z kwasem tiobarbiturowym (▨), miareczkowanie jodometryczne (■) i fluorescencją (□) w 2 ml próbkach nasienia ( $1,5 \cdot 10^9$  plemników tryka) inkubowanych w 37°C w obecności 0,2 mg askorbinianu sodu i 5,6  $\mu\text{g}$   $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  (38).

Tabela 1  
Charakterystyka morfologiczna plemników tryka [27]

	Plemniki (%)		
	świeże	inkubowane <sup>1</sup>	peroksydowane <sup>2</sup>
Wybarwione eozyną	19	49	97
Bez główek	0	4	1
Z normalnym akrosomem	94	83	45
Z uszkodzonym akrosomem	2	0	20
Bez akrosomu	4	17	35

<sup>1</sup> Przez 1 h.

<sup>2</sup> Inkubowane w obecności askorbinianu i  $\text{FeSO}_4$ .

Tabela 2

Poziom białka i aldehydu malonowego oraz aktywność niektórych enzymów w supernatancie uzyskanym z plemników tryka [27]

	Supernatant uzyskany z plemników			
	świeżych	inkubowa- nych	peroksydo- wanych <sup>1</sup>	po udarze chłodowym
Białko (mg/cm <sup>3</sup> )	—	—	0,9	0,9
Aldehyd malonowy (nmole/cm <sup>3</sup> )	2,3	5,2	77,3	5,3
LDH (J/dm <sup>3</sup> )	48,0	134,0	181,0	191,0
AspAT (J/dm <sup>3</sup> )	15,0	21,0	126,0	63,0
Hialuronidaza (J/dm <sup>3</sup> )	70,0	124,0	260,0	300,0
Fosfataza kwaśna (J/dm <sup>3</sup> )	14,9	21,6	56,6	59,9
B-N-acetyloglukozo- aminidaza (J/dm <sup>3</sup> )	159,8	226,4	346,3	274,4

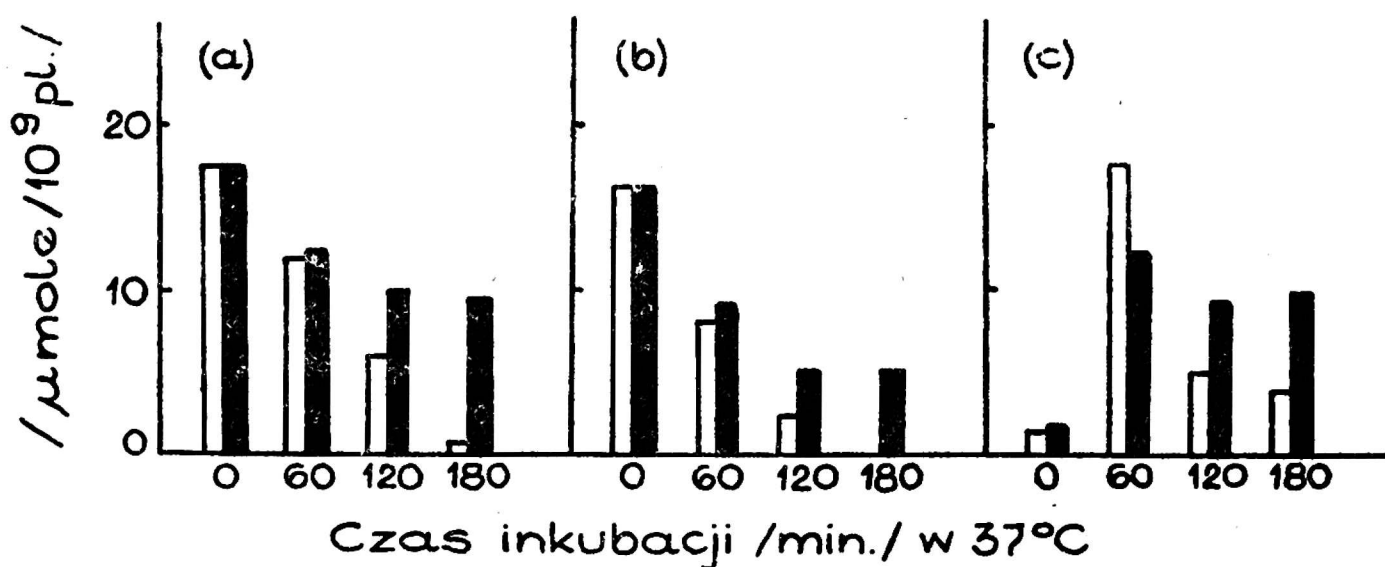
<sup>1</sup> Plemniki inkubowane w obecności askorbinianu i FeSO<sub>4</sub>.

nych fosfolipidów prowadzi do przzerwania plazmolemmy i zewnętrznej błony akrosomalnej. Błona mitochondrialna i włókna osiowe nie ulegają uszkodzeniu [28]. Badania składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów plazmolemmy i zewnętrznej błony akrosomalnej wykazały, że dominującą pozycję zajmuje tu kwas dekozaheksaenowy (C<sub>22:6</sub>) [27]. Wrażliwość struktur morfologicznych komórek plemnikowych na peroksydację lipidów w znacznym stopniu zależy od zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [53].

#### Wpływ peroksydacji lipidów na metabolizm plemników

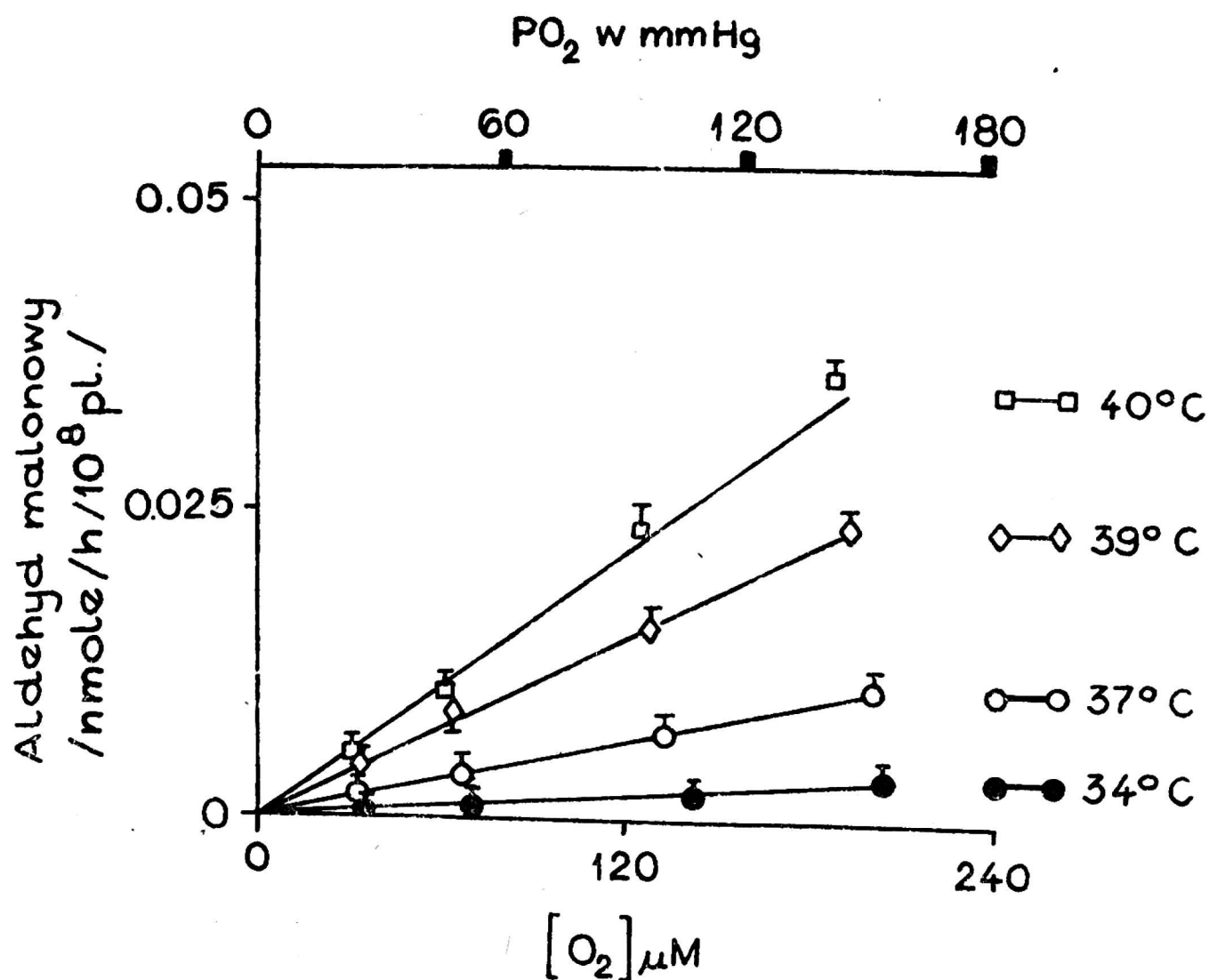
Peroksydacja lipidów znacznie obniża aktywność metaboliczną plemników [26, 27, 38, 53]. Peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych w plemnikach nieodwracalnie hamuje ich aktywność oddechową

i fruktolityczną. Powtórne przemywanie plemników czy dodatek fruktozy nie przywraca omawianych funkcji [26]. W obecności peroksydowanego kwasu arachidonowego ( $1,5 \text{ mb}/10^9$  plemników) szybkość zużycia tlenu przez komórki plemnikowe ulega znacznemu obniżeniu. Proces fruktolizy zostaje zahamowany [26]. Zużycie egzogennej fruktozy i mleczanu litu przebiega znacznie wolniej w plemnikach peroksydowanych. Natomiast akumulacja mleczanu z egzogennej fruktozy jest znacznie wyższa w plemnikach inkubowanych z dodatkiem askorbinianu i jonów żelazawych w porównaniu z frakcją komórek kontrolnych (rys. 3). Mniej



Rys. 3. Wpływ peroksydacji lipidów na (a) zużycie egzogennej fruktozy, (b) zużycie egzogennej mleczanu litu i (c) akumulację kwasu mlekowego syntetyzowanego z egzogennej fruktozy przez zawiesinę  $10^9$  przemytych plemników tryka (□) — próby kontrolne, (■) — plemniki inkubowane z askorbinianem i  $\text{FeSO}_4$  (27).

spójne są dane literaturowe na temat wpływu peroksydacji na poziom wewnątrzkomórkowego ATP. W plemnikach tryka odnotowano niekorzystny wpływ nadtlenków lipidów na poziom ATP [28]. Natomiast w plemnikach koguta produkty peroksydacji (do  $8 \text{ nmoli}$  aldehydu malonowego/ $10^9$  plemników) nie wywierały wpływu na poziom tego związku [63]. Endogenne produkty peroksydacji mogą modyfikować lub inaktywować niektóre białka zawierające grupy SH i enzymy [26, 31, 62]. Może to być jedna z przyczyn inaktywacji plemników, ponieważ białka strukturalne tych komórek zawierają dużą ilość cysteiny [26]. Szybkość syntezy aldehydu malonowego w plemnikach z ogona najądrzy królika przedstawia się jako liniowa funkcja koncentracji  $\text{O}_2$  w środowisku rozrzedzalnika w zakresie temperatur  $34\text{--}40^\circ\text{C}$  (rys. 4). Podobne zależności



Rys. 4. Szybkość peroksydacji lipidów w plemnikach z najądrzy królika jako funkcja koncentracji O<sub>2</sub> w zakresie temperatur 34—40°C (6). Dolna odcięta wskazuje koncentrację O<sub>2</sub> w środowisku zawiesiny, górna odcięta wskazuje PO<sub>2</sub> powyżej środowiska zawiesiny w zakresie 34—40°C dla podanych koncentracji O<sub>2</sub>. Każdy punkt jest średnią z 5 oddzielnych pomiarów.

obserwuje się w plemnikach z najądrzy myszy [6]. Stosunkowo niska temperatura około 32°C i niskie ciśnienie tlenu w środowisku moszny, gdzie zlokalizowane są jądra i najądrza pozwalają zatem na przedłużenie żywotności nasienia w przeciwieństwie do warunków panujących w jajowodach (37°C i wysokie PO<sub>2</sub>). Podatność plemników na procesy peroksydacji zależy od zawartości cynku i fruktozy w plazmie nasienia. W plemnikach człowieka uzyskanych z nasienia, w którym stosunek cynk/fruktoza w ich plazmie był wysoki (> 20) peroksydacja lipidów zachodziła w wolniejszym tempie w porównaniu z plemnikami uzyskanymi z nasienia, w których wartość ta była niższa (< 20) [24]. Innym aspektem peroksydacji lipidów dotyczącym pełnego nasienia jest związek między peroksydacją lipidów w gruczołach pęcherzykowych a syntezą i sekrecją.

prostaglandyn. Wydaje się, że istnieje bezpośrednia korelacja między tworzeniem nadtlenków lipidów, szacowanych ilością aldehydu malonowego a zdolnością do syntezy prostaglandyn. Aldehyd malonowy syntetyzowany jest głównie z cyklicznych endonadtlenków, stąd stymulujący wpływ na jego wytwarzanie przez kwas arachidonowy [52].

### *Wpływ peroksydacji lipidów na ruchliwość i wartość biologiczną nasienia*

Toksyczne nadtlenki lipidów gromadzą się z większą szybkością w plemnikach nieruchliwych lub o niskiej ruchliwości pochodzących z nasienia rzadkiego lub martwego.

Podatność plemników nieruchliwych na peroksydację jest prawie dwukrotnie wyższa w porównaniu z plemnikami zachowującymi wysoką ruchliwość a pochodzącymi z nasienia z normospermia. Po godzinie tlenowej inkubacji w temperaturze 37°C w obecności 0,125 nmoli askorbinianu sodu i 0,025 nmoli siarczanu żelazawego w plemnikach ruchliwych człowieka poziom aldehydu malonowego wynosił 10 nmoli/10<sup>8</sup> plemników a w plemnikach nieruchliwych powyżej 20 nmoli/10<sup>8</sup> plemników [38]. Wraz ze wzrostem stężenia produktów reakcji tiobarbiturowej w plemnikach człowieka obniża się ich ruchliwość [14]. Ruchliwość plemników buhaja po rozmrożeniu w ejakulatach, w których ilość aldehydu malonowego wynosiła poniżej 5 nmoli/10<sup>9</sup> plemników utrzymywała się na poziomie od 40 do 60%. Natomiast w plemnikach o zawartości aldehydu malonowego od 15 do 40 nmoli/10<sup>9</sup> plemników wartość ta wynosiła od 20 do 50%, średnio 30% [35]. Różnice te utrzymywały się również podczas inkubacji nasienia w temperaturze 37°C (rys. 5). Ruchliwość plemników królika z ogona najądrzy ustaje całkowicie przy zawartości 0,5 nmola aldehydu malonowego/10<sup>8</sup> plemników [2]. Toksyczne produkty peroksydacji lipidów obniżają zdolność zapładniającą plemników. W plemnikach koguta znaczne obniżenie zdolności zapładniającej odnotowano już przy poziomie 3 nmoli aldehydu malonowego/10<sup>9</sup> plemników. Plemniki z zawartością 6 nmoli aldehydu malonowego/10<sup>9</sup> plemników utraciły całkowicie zdolność zapładniającą [63]. Produkty peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych są w wysokim stopniu plemnikobójcze w stosunku do męskich komórek rozrodczych człowieka. Jeżeli zawiesina przemytych ruchliwych plemników o koncentracji komórek odpowiadającej normalnemu nasieniu jest traktowana tak niewielką ilością jak 30 nmoli nadtlenków lipidów/cm<sup>3</sup> zawiesiny to wszystkie komórki pozbawione są ruchliwości w ciągu kilku minut [38].



## Peroksydacja lipidów a konserwacja nasienia

Szybkość endogennej peroksydacji fosfolipidów w plemnikach konserwowanych jest uzależniona od składników rozrzedzalnika (tab. 3). Dodatek odpowiednio dobranych ilości jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i cytrynianu może wpływać hamująco na procesy peroksydacji i tym samym utrzymywać zdolność zapładniającą nasienia. Krioprotektory, glicerol i dimetylosulfotlenek (DMSO) częściowo hamują syntezę nadtlenków lipidów, lecz z drugiej strony obniżają zdolność zapładniającą. Substancje ochraniające membrany komórkowe (cholesterol, albumina surowicy bydlęcej) nie są zdolne do zahamowania procesów peroksydacji. W obecności jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$

Tabela 3

Wpływ niektórych rozrzedzalników i składników chemicznych na peroksydację lipidów w plemnikach koguta [17]

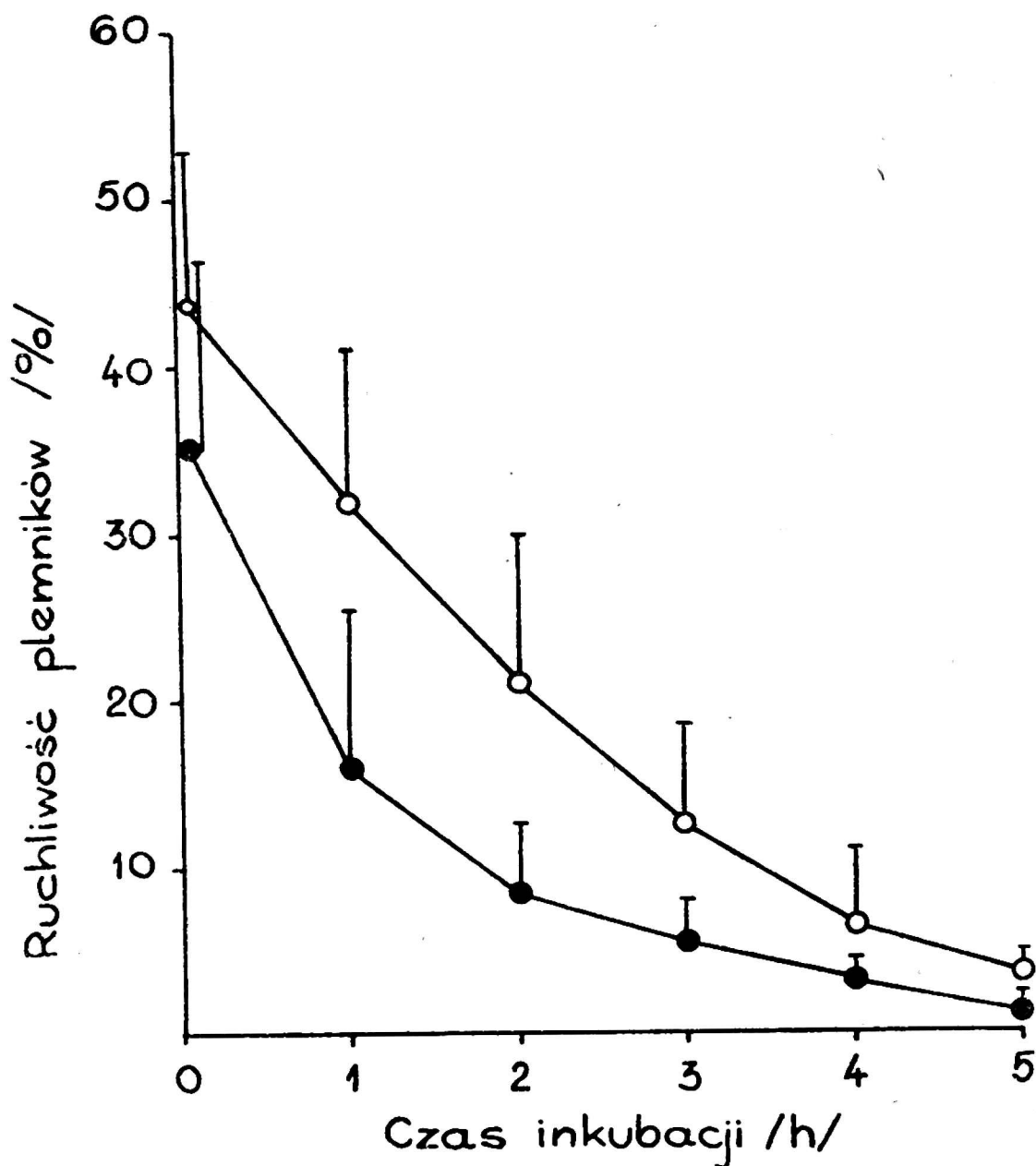
Rozrzedzalniki i dodatki	Nadtlenki lipidów (nmole MDA $10^9$ plemników)	Ruchliwość $z$	Uszkodzone plemniki (%)	Zapłodnione jaja (%)
Rozrzedzalniki				
Bufor fosforanowy <sup>1</sup>	126 $\pm$ 14,9 <sup>e4</sup>	0,3 $\pm$ 4,8 <sup>c</sup>	62,1 $\pm$ 4,8 <sup>c</sup>	0 [12] <sup>3</sup>
Rozrzedzalnik				
Ringer-fosforanowy	26,3 $\pm$ 2,5 <sup>ab</sup>	3,4 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	76,3 $\pm$ 3,5 <sup>d</sup>	0 [12]
Plazma nasienia	37,2 $\pm$ 4,7 <sup>c</sup>	3,7 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	83,6 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>	0 [12]
Plazma nasienia + bufor fosforanowy (1:2)	31,7 $\pm$ 4,5 <sup>abc</sup>	4,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	20,2 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	60,3 $\pm$ 8,8 [12]
Dodatki				
Wapń	18,1 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	29,6 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>	32,3 $\pm$ 11,5 [9]
Cytrynian	23,0 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	4,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	29,7 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	14,0 $\pm$ 7,8 [9]
Magnez	89,3 $\pm$ 5,5 <sup>d</sup>	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	50,2 $\pm$ 3,5 <sup>c</sup>	0 [9]
Albumina surowicy bydlęcej	134,4 $\pm$ 10,1 <sup>e</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>	71,4 $\pm$ 2,2 <sup>d</sup>	0 [6]
Cholesterol	138,3 $\pm$ 13,7 <sup>e</sup>	0,1 $\pm$ 0,0 <sup>d</sup>	62,3 $\pm$ 3,9 <sup>c</sup>	0 [6]
	96,0 $\pm$ 7,7 <sup>d</sup>	1,3 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	56,7 $\pm$ 3,8 <sup>c</sup>	0 [6]
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	88,1 $\pm$ 11,9 <sup>d</sup>	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	56,3 $\pm$ 3,0 <sup>c</sup>	0 [6]

<sup>1</sup> Bufor fosforanowy był kontrolnym rozrzedzalnikiem do którego dodawano wymienione w tabeli czynniki. Do wszystkich rozrzedzalników dodawano askorbinian w celu katalizy peroksydacji lipidów.

<sup>2</sup> Ruchliwość plemników określano metodą Wheelera i Andrewsa (61).

<sup>3</sup> Liczba inseminowanych kur.

<sup>4</sup> Średnie z sześciu obserwacji. Wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ( $P < 0,05$ ).



Rys. 5. Wpływ różnych przedziałów zawartości aldehydu malonowego (o-o) — poniżej 5 nmoli/10<sup>9</sup> plemników/h, (o-o) — powyżej 15 nmoli/10<sup>9</sup> plemników na ruchliwość plemników buhaja inkubowanych w temperaturze 37°C (35).

szybkość peroksydacji ulega znacznemu obniżeniu [2]. Jony Na<sup>+</sup> wywierają korzystny wpływ na ruchliwość plemników szczura a nawet mogą ją przywracać, kiedy komórki uległy immobilizacji po zawieszeniu w chlorku choliny [64]. Dwuwartościowe jony wapnia również wpływają dodatnio na ruchliwość plemników szczura [47] czy myszy [21]. Nasienie koguta przechowywane 24 godziny w rozrzedzalniku zawierającym kwas cytrynowy i cytrynian sodu w temperaturze 2–5°C nie zmienia swej zdolności zapładniającej [28, 59]. Plazma nasienia koguta wpływa hamująco na procesy peroksydacji w komórkach plemnikowych [17]. Podobne właściwości wykazuje plazma nasienia buhaja i bawołu [11, 12, 13, 52].

W plazmie nasienia buhaja wykryto termostabilny czynnik antyoksydacyjny [13]. Omawiany czynnik hamuje procesy peroksydacji w plemnikach a także w mitochondriach mózgu i wątroby. Natomiast dializowana plazma nasienia tryka czy ogiera nie wykazuje ochronnej funkcji wobec procesów peroksydacji [27]. W obecności przeciwutleniaczy szybkość peroksydacji endogennych fosfolipidów w plemnikach jest znacznie niższa [25].

Związki te mogą również hamować toksyczny wpływ egzogennych nadtlenków lipidów. Prewencyjne właściwości wykazuje także dializowane żółtko jaja kurzego [27].

Podatność plemników na peroksydację lipidów jest wybitnie zwiększona po uprzednim poddaniu ich udarowi chłodowemu [33, 34, 35, 54, 56, 57]. Te same czynniki, które chronią plemniki przed szkodliwym wpływem peroksydacji np. butylowany hydroksytoluen także częściowo ochraniają te komórki przed uszkodzeniami spowodowanymi udarem chłodowym [25, 27, 28, 51]. Szybkość syntezy nadtlenków lipidów przez plemniki buhaja poddane udarowi chłodowemu jest kilkakrotnie wyższa niż w nasieniu świeżym [33, 34, 35]. Poziom syntetyzowanego aldehydu malonowego w plemnikach buhaja konserwowanych w ciekłym azocie nie koreluje z wyciekami aminotransferazy asparaginianowej do środowiska zewnątrzkomórkowego [35]. Dane te wydają się sugerować, że zakłócenia struktur błon komórkowych konserwowanych plemników buhaja wywołane są raczej udarem chłodowym niż zmianami peroksydacyjnymi. W mrożonych plemnikach buhaja, w których poziom syntetyzowanego aldehydu malonowego po godzinie indukowanej peroksydacji wynosił od 1,3 do 40 nmoli/10<sup>9</sup> plemników nie odnotowano istotnych uszkodzeń akrosomu [35]. Przechowywanie nasienia w ciekłym azocie w miarę skutecznie zapobiega pogłębianiu się procesów starzeniowych w komórkach plemnikowych [33, 34, 35]. Istotne znaczenie dla przebiegu procesów peroksydacji w plemnikach ma utrzymanie optymalnej koncentracji komórek w dawce inseminacyjnej. Szybkość syntezy aldehydu malonowego jest bowiem ujemnie skorelowana z koncentracją plemników w dawce [35].

### *Podsumowanie*

Peroksydacja lipidów jest jednym z podstawowych procesów biochemicznych przyspieszających starzenie się plemników. Gromadzące się w komórkach produkty peroksydacji są silnie plemnikobójcze. Peroksydowane plemniki tracą ruchliwość i zdolność zapładniającą. Procesy peroksydacji lipidów przebiegają znacznie szybciej w plemnikach konserwo-

wanych. Dla podtrzymania tych szkodliwych procesów istotny jest dobór składników rozrzedzalnika, postępowanie technologiczne jak i sposób przechowywania nasienia. Udar chładowy wybitnie zwiększa podatność męskich komórek rozrodczych na procesy peroksydacji. Natomiast przechowywanie nasienia w ciekłym azocie w miarę skutecznie zapobiega pogłębianiu się tych procesów w plemnikach.

Badania zjawisk peroksydacji lipidów mogą stanowić zasadnicze źródło informacji o procesie starzenia się plemników. Jednocześnie należy podkreślić, że test nadtlenkowy może być pomocny przy opracowaniu i weryfikacji metod konserwacji nasienia zwierząt.

#### LITERATURA

1. Aleman V., Handler P.: *J. biol. Chem.*, 242, 4087—4091, 1967.
2. Alvarez J.G., Storey B.T.: *Biology Reprod.*, 27, 1102—1108, 1982.
3. Alvarez J.G., Storey B.T.: *Biology Reprod.*, 28, 1129—1136, 1983a.
4. Alvarez J.G., Storey B.T.: *Biology Reprod.*, 30, 323—331, 1984a.
5. Alvarez J.G., Storey B.T.: *Biology Reprod.*, 30, 833—841, 1984b.
6. Alvarez J.G., Storey B.T.: *Biology Reprod.*, 32, 342—351, 1985.
7. Brown D.V. i in.: *J. Reprod. Fert.*, 50, 117—118, 1977.
8. Cadenas E.: Oxidative stress and formation of excited species. *Oxidative Stress*. H. Sies, Academic Press. 311—330, 1985.
9. Chance B., Sies H., Boveris A.: *Physiol. Rev.*, 59, 527—605, 1979.
10. D'Aoust B.G.: *Science*, 168, 576—578, 1969.
11. Dawra R.K., Sharma O.P., Makkar H.P.S.: *Int. J. Fert.*, 28 (4), 231—234, 1983.
12. Dawra R.K., Sharma O.P., Makkar H.P.S.: *Biochem. Int.*, 8, 655—659, 1984.
13. Dawra R.K., Sharma O.P.: *Biochem. Int.*, 11 (3), 333—339, 1985.
14. Diezel W. i in.: *Andrologia*, 12, 167—171, 1980.
15. Fietta P. i in.: *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 58, 1079—1085, 1982.
16. Fridovich J.: *J. biol. Chem.*, 245, 4053—4057, 1970.
17. Fujihara N., Koga O.: *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 385—390, 1984.
18. Haber F., Weiss J.: *Proc. R. Soc. (London)*, A, 147, 332—337, 1934.
19. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Archs Biochem. Biophys.*, 246 (2), 501—514, 1986.
20. Harris M.J., Herp A., Pigman W.: *Archs Biochem. Biophys.*, 142, 615—617, 1971.
21. Heffner L.J., Storey B.T.: *J. Exp. Zool.*, 218, 427—434, 1981.
22. Hobbs T.D., Harris G.C.: *Poult. Sci.*, 42, 254—259, 1963.
23. Holland M.K., Alvarez J.G., Storey B.T.: *Biology Reprod.*, 27, 1109—1119, 1982.
24. Johnsen Q., Eliasson R., Samuelson U.: *Acta physiol. scand.*, 116, 305—307, 1982.
25. Jones R., Mann T.: *Proc. R. Soc. B*, 193, 317—333, 1976.
26. Jones R., Mann T.: *Reprod. Fert.*, 50, 255—260, 1977a.

27. Jones R., Mann T.: *Reprod. Fert.*, 50, 261—268, 1977b.
28. Jones R., Mann T., Sherins R.: *Fert. Steril.*, 31, 531—536, 1979c.
29. Kantola M., Saaranen M., Vanha-Perttula T.: *J. Reprod. Fert.*, 83, 785—794, 1988.
30. Kro-Lang Fong i in.: *J. biol. Chem.*, 248, 7792—7798, 1973.
31. Lewis S.E., Wills E.D.: *Biochem. Pharmac.*, 11, 901—912, 1962.
32. Li T.: *Biology Reprod.*, 12, 641—646, 1975.
33. Luberda Z., Strzeżek J.: *Mat. XXI Zjazdu PTB*, Kraków, 26—28.IX.1985, s. 181.
34. Luberda Z., Strzeżek J., Kościński P.: *Mat. XXIV Zjazdu PTNW Olsztyn*, 19—20.IX.1985, s. 53.
35. Luberda Z., Strzeżek J., Pesta M.: *Medycyna Wet.*, 6, 356—359, 1989.
36. Magnes L.J., Li T.K.: *Biology Reprod.*, 22, 965—969, 1980.
37. Mann T., Lutwak-Mann C.: *Biochem. J.*, 43, 266—270, 1948.
38. Mann T., Lutwak-Mann C.: *Male Reproductive Function and Semen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, s. 212—216.
39. Mc Cord J.M., Fridovich J.: *J. biol. Chem.*, 244, 6049—6055, 1969.
40. Mc Cord J.M., Fridovich J.: *J. biol. Chem.*, 245, 1374—1379, 1970.
41. Menella M.N.R., Jones R.: *Biochem. J.*, 191, 289—297, 1975.
42. Michalski W.P.: *Post. Bioch.*, 21, 295—317, 1975.
43. Misra H.P., Fridovich J.: *J. biol. Chem.*, 247, 188—192, 1970.
44. Misra H.P., Fridovich J.: *J. biol. Chem.*, 246, 6886—6890, 1972.
45. Misra H.P., Fridovich J.: *J. biol. Chem.*, 247, 3170—3175, 1972.
46. Misra H.P., Fridovich J.: *J. biol. Chem.*, 247, 6960—6962, 1972.
47. Morton B.E., Sagadraca R., Fraser C.: *Fert. Steril.*, 29, 694—698, 1978.
48. Nilsson R., Pick F.M., Bray R.C.: *Biochim. biophys. Acta*, 192, 145—152, 1969.
49. Ottolenghi A.: *Archs Biochem. Biophys.*, 79, 355—363, 1959.
50. Pfeiffer P.M., Mc Coy P.B.: *J. biol. Chem.*, 246, 6401—6408, 1971.
51. Pursel V.G.: *Biology Reprod.*, 21, 319—324, 1979.
52. Robak J., Sobańska B.: *Biology Reprod.*, 6, 204—210, 1976.
53. Sidhu K.S., Guraya S.S.: *Buffalo J.*, 1, 37—44, 1985.
54. Sławeta R., Wąsowicz W., Laskowska T.: *J. vet. Med., A*, 35, 455—460, 1988.
55. Smith D.G. i in.: *Biology Reprod.*, 20, 377—383, 1979.
56. Strzeżek J.: *Mat. Letniej Szkoły Młodych Pracowników Nauki Olsztyn*, 16—20.VI.1986, s. 67—97.
57. Strzeżek J.: *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 340, 9—40, 1987.
58. Tappel A.L., Zalkin H.: *Archs Biochem. Biophys.*, 80, 326—332, 1959.
59. Van Wambeke F.: *J. Reprod. Fert.*, 13, 571—575, 1967.
60. Waver R., Ondega B., Van Gelder B.F.: *Biochim. biophys. Acta*, 302, 475—478, 1973.
61. Wheeler N.G., Andrews F.N.: *Poult. Sci.*, 22, 361—367, 1943.
62. Wills E.D.: *Biochim. biophys. Acta*, 98, 238—251, 1965.
63. Wishart G.J.: *J. Reprod. Fert.*, 71, 113—118, 1984.
64. Wong P.Y.D., Lee W.M., Tsang A.F.Y.: *Exp. Cell Res.*, 131, 97—104, 1981b.