SciCell

ODBORNÝ MAGAZÍN

WWW.SCICELL.ORG

2026



ISSN 2585-9137
Vydavateľstvo SciCell

SciCell Magazín



Úloha antioxidantov v kryokonzervácii samčích pohlavných buniek hospodárskych zvierat

Publikované 21. novembra 2023

Hana Greifová, Tomáš Jambor, Katarína Tokárová, Denis Bažány, Norbert Lukáč
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Ústav aplikovanej biológie, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika. Email: hgreifova@gmail.sk

Úvod

Umelá inseminácia predstavuje prvú generáciu biotechnologického pokroku, ktorý výrazne prispel k zlepšeniu genetických vlastností hospodársky významných zvierat, pri ktorých sa využíva ejakulát jedného samca na insemin——áciu viacerých samíc. Tieto techniky poskytujú pre chovateľskú prax a živočíšnu výrobu mnohé výhody. Ide najmä o zvyšovanie kvality genofondu pre zlepšenie úžitkových vlastností zvierat a pokles rizika prenosu chorôb, nakoľko sa eliminuje fyzický kontakt medzi zvieratami. V neposlednom rade sú to tiež ekonomické dôvody, ktoré sa prejavia v poklese pracovných a materiálových nákladov v živočíšnej výrobe. Umelá inseminácia by nebola možná bez techník dlhodobého uchovávania samčieho genetického materiálu, čo zabezpečuje proces kryokonzervácie spermií v podobe inseminačných dávok. Zmrazovanie, ale aj rozmrazovanie spermií pred samotnou insemin——áciou, však vedie k nadprodukcii voľných radikálov, konkrétnejšie reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ktoré preukázateľne zhoršujú pohyblivosť spermií, poškodzujú ich membránu a predovšetkým znižujú fertilizačný potenciál spermií. Prvá publikácia, ktorá naznačovala škodlivé účinky reaktívnych foriem kyslíka na spermie bola uverejnená už pred 80 rokmi a v súčasnosti je všeobecne známe, že nadprodukcia ROS je spájaná s poškodením funkcií samčích gamét s následnou infertilitou. Dôležitým aspektom ovplyvňujúcim úspešnosť umelej inseminácie je teda pridávanie protektívnych látok s antioxidačnou aktivitou do zmrazovacieho média. Hoci samotné spermie a semenná plazma disponujú prirodzeným obranným antioxidačným systémom, pri kryokonzervácii dochádza v spermatických bunkách k rozvoju oxidatívneho stresu. Z tohto dôvodu sa množstvo štúdií venuje problematike doplnenia antioxidantov k ejakulátu, pričom aditívne látky by mali mať schopnosť ochrániť samčie reprodukčné bunky nielen počas procesu zmrazovania vzoriek, ale zachovať optimálne prostredie aj po ich rozmrazení a počas následnej manipulácie.

Kryokonzervácia

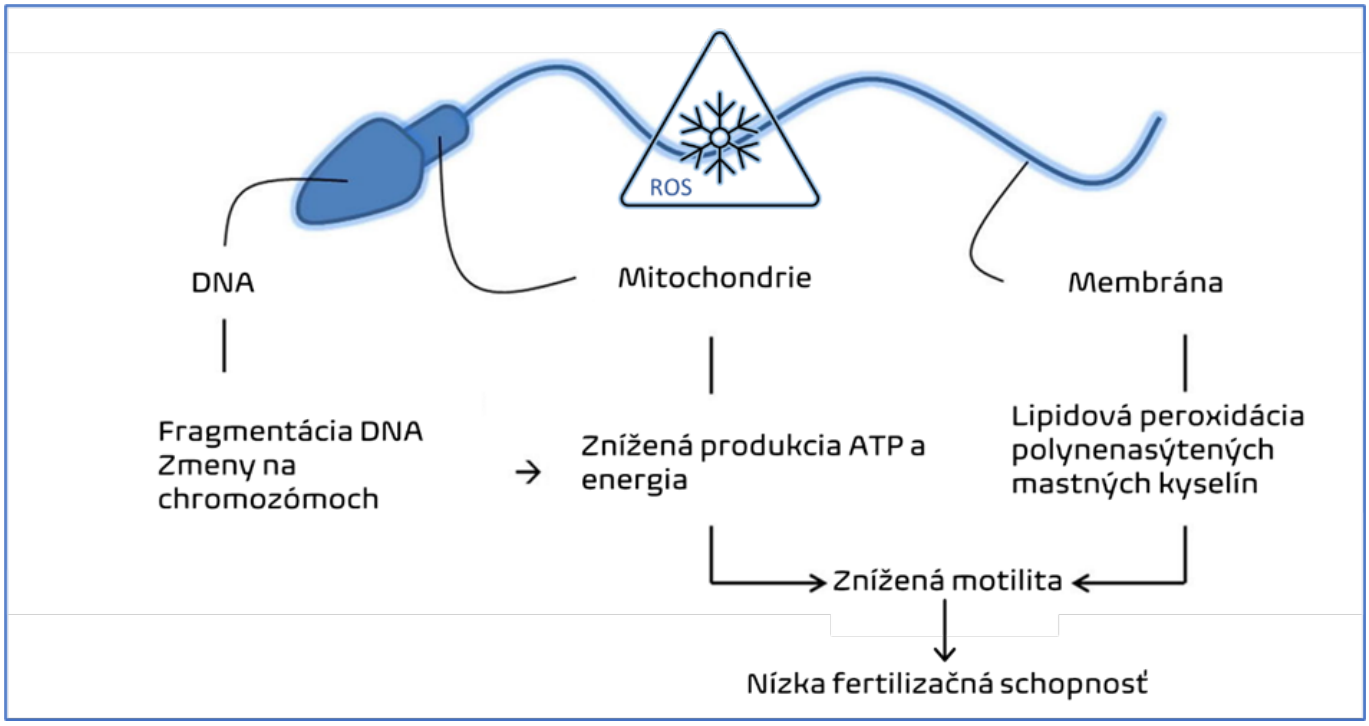
Za osvedčený a efektívny spôsob uchovávania ejakulátu hospodárskych zvierat sa považuje už niekoľko desaťročí jeho konzervovanie mrazením. Aj napriek neustálej snahe optimalizovať kryokonzervačné protokoly sa nedá pri zmrazovaní úplne vyhnúť poškodeniu zárodočných buniek. Reakcia samčích gamét na jednotlivé kroky kryoknzervácie sa značne líši u jednotlivých druhov zvierat, ale všeobecne platí, že spermie prežúvavcov sú v porovnaní s inými druhmi extrémne citlivé na teplotné zmeny v priebehu konzervácie. Zmrazovacie protokoly sa líšia v rade prvkov celého procesu, základné kroky majú ale všetky postupy spoločné. Zahŕňajú odber ejakulátu a jeho riedenie v mraziacom extenderi, ktorého obsah a koncentrácia jednotlivých zložiek (zmes solí, sacharidov, proteínov, lipidov a antibiotík) sa líši v závislosti od živočíšneho druhu a použitého protokolu. Ďalej sa materiál balí do uzatvorených pejet o rôznom priemere, ochladzuje sa a zmrazuje pomocou tekutého dusíka a jeho pár. Takto sa zabezpečí zakonzervovanie spermií, ktoré sa dlhodobo skladujú v tekutom dusíku pri teplote -196 °C.

Všeobecne platí, že zmrazovanie spermií vedie k poklesu výskytu životaschopných spermií približne o 50-60 %, preto je pre úspešné oplodnenie potrebná až trikrát väčšia dávka biologického materiálu, ako pri použití čerstvého ejakulátu. Kvalita kryokonzervvaných spermií závisí najmä od rýchlosti zmrazovania a rozmrazovania a tiež od zloženia extenderov, ktoré slúžia ako médium pre riedenie odobratého ejakulátu.

Oxidatívny stres

S rozvojom oxidačného stresu v bunkách sú spojené početné fyziologické i patofyziologické javy, ako je napríklad starnutie, zápal, karcinogenéza alebo imunologická obrana proti infekciám. Oxidačný stres sa považuje za jeden z najdôležitejších faktorov, ktorý prispieva k nízkej kvalite kryokonzervovaných spermií. Poškodenie buniek je vyvolané nadmernou produkciou kyslíkových a od kyslíka odvodených oxidantov a neschopnosťou biologického systému rýchlo detoxikovať tieto reaktívne intermediáty, alebo rýchlo zahájiť reparačné mechanizmy na opravu už vzniknutých škôd.

K nadprodukcii voľných radikálov dochádza v priebehu celého procesu kryokonzervácie a následného rozmrazovania ejakulátu. Navyše je preukázaný aj vzťah oxidačného stresu k znižovaniu koncentrácie prirodzených bunkových antioxidantov, ktoré proti voľným radikálom bojujú. Dochádza tak k nerovnováhe medzi tvorbou voľných radikálov a dostupnými antioxidačnými mechanizmami bunky. Okrem bunkových proteínov a DNA je vysoko citlivá na pôsobenie oxidatívneho stresu najmä plazmatická membrána spermií, pričom tento fakt je spojený s jej lipidovým charakterom. Membrána spermií totiž obsahuje vysokú koncentráciu polynenasýtených mastných kyselín, ktoré primárne podliehajú poškodeniu vplyvom voľných radikálov v procese lipidovej peroxidácie. Tento dej prebieha mechanizmom reťazových reakcií, ktoré vedú k trvalému poškodeniu bunkovej membrány a tým k celkovému narušeniu funkcií spermatickej bunky a jej schopnosti fertilizácie po rozmrazení.



Oxidačné poškodenie spermie vplyvom kryokonzervačného procesu

Antioxidačné suplementy pridávané do mraziacich médií

Často využívaným antioxidantom v kryokonzervačným médiách je vitamín E, ktorý v kombinácii s vitamínom C výrazne zlepšuje životaschopnosť spermií a kvalitatívne parametre spermií po rozmrazení. Vitamín E predstavuje najefektívnejšiu antioxidačnú zlúčeninu, ktorá neutralizuje lipidové radikály práve preto, že je to molekula rozpustná v tukoch a poskytuje tak významnú ochranu citlivej lipidovej membráne spermií. Vo vode rozpustným analógom vitamínu E je trolox, ktorý má vysokú schopnosť zachytávať voľné radikály a rovnako sa často využíva na suplementáciu mraziacich médií. Účinnú zlúčeninu predstavuje tiež glutatión, ktorý sa priamo podieľa na neutralizácii reaktívnych foriem kyslíka, ako aj na udržiavaní vitamínov E a C vo funkčnej forme. Vzhľadom na nízky obsah bunkovej cytoplazmy v spermiách, prirodzenú antioxidačnú ochranu spermií predstavuje najmä semenná plazma, ktorá obsahuje antioxidačné enzýmy ako superoxiddismutáza a kataláza. Riedenie spermií v mraziacich médiách teda logicky obsah týchto enzymatických antioxidačných systémov znižuje, preto sa tiež do extenderov kryokonzervovaných spermií často pridávajú exogénne. Ďalšou využívanou zlúčeninou je L-cysteín, neesenciálna aminokyselina, ktorá ľahko preniká bunkovou membránou a podieľa sa na vnútrobunkovej produkcii vyššie spomínaného glutatiónu a pôsobí tiež ako stabilizátor membrán. Za zmienku stojí aj melatonín, ktorý sa prirodzene vyskytuje v semennej plazme a do médií sa pridáva ako stimulant antioxidačných enzýmov a zachytávač reaktívnych foriem kyslíka a dusíka. Selén predstavuje dobre známy stopový prvok, ktorý rovnako zohráva dôležitú úlohu pri aktivácii antioxidačných enzýmov a pri suplementácii mraziacich extenderov dosahuje dobré výsledky.

Z prírodných antioxidantov, ktoré poskytujú vysokú mieru ochrany kryokonzervovaným spermiám pred účinkami oxidačného stresu, je to napríklad izoflavón genisteín, ktorý sa prirodzene vyskytuje v sóji a iných strukovinách. Má priamy antioxidačný účinok na integritu DNA spermií, znižuje produkciu reaktívnych foriem kyslíka a zlepšuje pohyblivosť spermií po rozmrazení. Resveratrol a kvercetín ako polyfenolické látky so silnou antioxidačnou aktivitou preukázali svoj protektívny účinok na kryokonzervované spermie schopnosťou vychytávania voľných radikálov a znižovaním peroxidácie membránových lipidov. Najúčinnejší a ľahko dostupný karotenoid je lykopén, ktorý je

schopný zabrániť peroxidácii v semennej plazme. β-karotén rovnako chráni bunkové membrány spermií pred peroxidáciou lipidov. Prítomnosť lykopénu v mraziacich extenderoch zlepšuje životaschopnosť spermií po rozmrazení, chráni integritu DNA a udržiava nízku mieru lipoperoxidácie v membránach. Katechíny ako biologicky aktívne látky so silnou antioxidačnou vlastnosťou sa prirodzene vyskytujú v zelenom čaji. Ich antioxidačná aktivita je 20-násobne vyššia ako napríklad pri vitamíne C a preukázateľne znižujú hladiny reaktívnych foriem kyslíka v kryokonzervovaných spermiách.

Záver

Kryokonzervácia spermií je základným predpokladom úspešnosti umelej inseminácie, ktorá patrí k bežným biotechnologickým postupom riadenej reprodukcie hospodársky významných zvierat. Tento proces dlhodobého uchovávania samčieho genetického materiálu však negatívne ovplyvňuje kvalitu spermií po ich rozmrazení, čo sa prejavuje zhoršením morfológie, pohyblivosti, samotnej životaschopnosti a integrity DNA spermií. Doplňanie mraziacich médií antioxidačnými látkami sa považuje za účinný spôsob ochrany spermií býkov, baranov, kancov, psov, ale aj ľudí, pred oxidatívnym stresom, ktorý sa považuje za hlavný faktor zlej kvality kryokonzervovaných spermií. Treba však pripomenúť, že účinok každého antioxidantu v kryomédiu závisí od živočíšneho druhu, koncentrácie a typu použitého média, čo robí z tejto technológie z pohľadu vývoja optimálnych aplikácií antioxidačných zlúčením a ich kombinácií beh na dlhú trať.

Poďakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Tvorba nukleových stád dojníc s požiadavkou na vysoký zdravotný status cestou využitia genomickej selekcie, inovatívnych biotechnologických metód a optimálneho manažmentu chovu, NUKLEUS 313011V387, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra

Agarwal, A., Prabakaran, S. A., Said, T. M. (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology*, 26(6), 654-660. DOI: https://doi.org/10.2164/jandrol.05016

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Mens Health*, 32(1), 1-17. DOI: https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1

Al-Mutary, M. G. (2021). Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: A review. *Journal of King Saud University – Science*, 33(1), 101226. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.10.023

Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M. et al. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank* 17, 745–756. DOI: https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5

Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 49(21), 1-7. DOI: https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x

Bailey, J. L., Morrier, A., Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Canadian Journal of Animal Science,* 83(3), 393-401. DOI: https://doi.org/10.4141/A03-024

Bansal, A. K., Bilaspuri, G. S. (2011). Impact of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International,* 2011, 1-7. DOI: https://doi.org/10.4061/2011/686137

Baracaldo, M. I., Barth, A. D., Bertrand, W. (2007). Steps for freezing bovine semen collection to the liquid nitrogen tank. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine.* Online: https://www.ivis.org/library/reviews-veterinary-medicine/steps-for-freezing-bovine-semen-from-seme

n-collection-to-liquid

Bucak, M.N., Sariozkan, S., Tuncer, P.B. et al. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (Capra hircus ancryrensis) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89, 24–30. DOI: https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.015

Budai, C., Egerszegi, I., Olah, J., Javor, A., Kovacs, A. (2014). The protective effect of antioxidants on liquid and frozen stored ram semen – Review. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 47(1), 46-52. Online: https://www.semanticscholar.org/paper/The-protective-effect-of-antioxidants-on-liquid-and-Budai-Egerszegi/b81521a9a7353bece9bd5cd04e54bdb0d7b55e15

Buyukleblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N. et al. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, 150(3-4), 77-83. DOI: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006

Hammadeh, M. E., Filippos, A., Hamad, M. F. (2009). Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *International Journal of Fertility and Sterility*, 3(3), 87-110. DOI: https://doi.org/10.22074/IJFS.2009.45769

Kucuk, N., Aksoy, M., Ucan, U. et al. (2014). Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology*, 68, 327-331. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.04.009

Len, J.S., Koh, W. S. D., Tan S. (2019). The role of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. Bioscience Reports, 39(8), BSR20191601. DOI: https://doi.org/10.1042/BSR20191601

Loomis, P. R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4), 191-200. DOI: https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00156-7

Majzoub, A., Agarwal, A. (2020). Antioxidants in sperm cryopreservation. In: Parekattil, S., Esteves, S., Agarwal, A. (eds) Male Infertility. Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4_54

Raina, V. S., Gupta, A. K., Singh, K. (2002). Effect of antioxidant fortification on preservability of buffalo semen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(1), 16-18. Online: https://www.animbiosci.org/upload/pdf/15_4.pdf

Rasul, Z., Ahmad, N., Anzar, M. (2001). Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of Buffalo spermatozoa. *Journal of Andrology*, 22(2), 278-283. DOI: https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02181.x

Ribas-Maynou, J., Mateo-Otero, Y., Delgado-Bermúdez, A., Bucci, D., Tamanini, C., Yeste, M., Barranco, I. (2021). Role of exogenous antioxidants on the performance and function of pig sperm after preservation in liquid and frozen states: A systematic review. *Theriogenology*, 173, 279-294. DOI: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.023

Silva, F.E. (2017). Antioxidant properties of polyphenols and their potential use in improvement of male fertility: A Review. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research,* 1. DOI: https://doi.org/10.26717/BJSTR.2017.01.000259

Tatone, C., Di Emidio, G., Vento, M., Ciriminna, R., Artini, P. G. (2010). Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. Gynecological Endocrinology, 26(8), 563-567. DOI: https://doi.org/10.3109/09513591003686395

Tiwari, S., Dewry, R. K., Srivastava, R., Nath, S., Mohanty, T. K. (2022). Targeted antioxidant delivery

modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation. *Theriogenology*, 179, 22-31. DOI: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.013

Zubair, M., Ali, M., Ahmad, M., et al. (2015). Effect of Selenium and Vitamin E on cryopreservation of semen and reproductive performance of animals (a review). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(1), 82-86. Online: https://www.entomoljournal.com/vol3Issue1/pdf/2-5-19.1.pdf