

BIOMARKERJI V SEMENSKI PLAZMI KOT FAKTORJI NAPOVEDI KAKOVOSTI KRATKOTRAJNO HRANJENEGA MERJAŠČEVEGA SEMENA

Maja Zakošek Pipan^{1*}, Janko Mrkun¹, Breda Jakovac Strajn², Katarina Pavšič Vrtač², Janko Kos^{3,4}, Anja Pišlar³, Alenka Nemec Svete⁵, Petra Zrimšek⁶

¹Klinika za reprodukcijo in velike živali, ²Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, ³Katedra za farmacevtsko biologijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, ⁴Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana, ⁵Klinika za male živali, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, ⁶Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

maja.zakosekpijan@vf.uni-lj.si

V raziskavi smo ugotavljali možnost napovedovanja kakovosti tri dni tekoče hranjenega merjaščevega semena s pomočjo parametrov oksidativnega stresa (superoksid dismutazo (SOD), skupno antioksidantno kapaciteto (TAC), in produkti, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino (TBARS)), mikroelementov prisotnih v semenski plazmi (baker (Cu), železo (Fe), cink (Zn) in selen (Se)) in faktorja TNF- α .

Aktivnost SOD izmerjena v semenski plazmi na dan odvzema semena je kot edini parameter oksidativnega stresa statistično značilno korelirala s preživitveno sposobnostjo semenčic in progresivno gibljivostjo po treh dneh hranjenja semena, prav tako je s preživitveno sposobnostjo semenčic korelirala koncentracija TNF- α ($P < 0,05$). Med mikroelementi je koncentracija Se statistično značilno korelirala z večino parametrov kakovosti semena po hranjenju ($P < 0,05$).

Glede na omenjene rezultate lahko kot dodatno metodo za določanje kakovosti semena po treh dneh hranjenja uporabimo koncentracijo Se, aktivnost SOD in koncentracijo TNF- α v sveži semenski plazmi. Aktivnost SOD in TNF- α smo tudi diagnostično ovrednotili in ugotovili, da sta oba zanesljiva pokazatelja kakovosti semena po treh dneh hranjenja. Naši rezultati prispevajo k iskanju ustreznega markerja za napovedovanje kakovosti merjaščevega semena po tekočem hranjenju.

Ključne besede: merjaščevo seme; tekoče hranjenje; biomarkerji

Uvod

V razvitih državah sveta za osemenjevanje svinj najpogosteje uporabljamo kratkotrajno hranjeno merjaščevo seme, ki ga pred shranjevanjem pregledamo in tako določimo gibljivost, progresivno gibljivost, koncentracijo semenčic in delež morfoloških napak na semenčicah. S tem pregledom lahko uspešno izločimo vzorce semena neustrezne kakovosti, ne moremo pa zagotoviti, da bo seme ustrezne kakovosti takšno ostalo tudi po kratkotrajnem hranjenju (1). Potreba po zanesljivem biomarkerju, s katerim bi lahko napovedali kakovost semena po kratkotrajnem hranjenju pri 15-20°C, je torej velika (2). Pri ugotavljanju potencialnih biomarkerjev smo se odločili za:

- parametre oksidativnega stresa (superoksid dismutaza (SOD), skupna antioksidantna kapaciteta (TAC) in produkti, ki reagirajo s tiobarbiturno kislino (TBARS)), saj so merjaščeve semenčice močno občutljive na oksidativni stres, ki je prisoten tudi med

pripravo in tekočim hranjenjem semena, še posebej pri nezadostnem antioksidantnem obrambnem mehanizmu semenčic (3),

- mikroelemente semenske plazme, saj v zadnjem obdobju odkrivamo njihovo pomembno vlogo pri plodnosti oziroma njihov vpliv na kakovost semena (4),
- TNF- α , v semenski plazmi merjascev, ker so bile ugotovljene številne korelacije s parametri kakovosti svežega semena (5).

Material in metode

Ejakulati so bili takoj po odvzemu razredčeni z razredčevalcem BTS v razmerju 1:2 in dostavljeni v laboratorij, kjer smo jim določili koncentracijo, delež gibljivih, progresivno gibljivih in živih semenčic, ter delež semenčic z morfološkimi napakami. Določali smo tudi kapacitacijo semenčic in delež semenčic z akrosomalno reakcijo.

V sveži semenski plazmi smo določali vrednosti SOD, TAC, TBARS, TNF- α in mikroelemente (Se, Zn, Cu, Fe). Dodatno smo določali tudi DNK fragmentacijo, membranski in mitohondrijski potencial ter integriteto membrane semenčic s testom HOST.

Parametre oksidativnega stresa (TBARS in SOD), ter faktor TNF- α , izmerjene v semenski plazmi svežega merjaščevega semena, smo diagnostično ovrednotili z vidika napovedi kakovosti merjaščevega semena po kratkotrajnem hranjenju. S pomočjo analize ROC (karakteristika sprejemnika), smo določili specifičnost in občutljivost testa pri vseh možnih mejnih vrednostih. Določili smo optimalno mejno vrednost določenih parametrov, na podlagi katerih smo najzanesljiveje ločili vzorce semena v ustrezne in neustrezne po treh dneh hranjenja. Kriteriji za ustrezne vzorce so bili: preživitvena sposobnost > 85 %; delež gibljivih semenčic > 70 %; delež progresivno gibljivih semenčic > 25 %; delež morfološko normalnih semenčic > 50 % .

Rezultati

Med oksidativnimi parametri je TBARS statistično značilno koreliral z gibljivostjo semenčic ($P < 0,05$), aktivnost SOD pa s preživitveno sposobnostjo semenčic in progresivno gibljivostjo ($P < 0,05$). Med mikroelementi je koncentracija Se statistično značilno pozitivno korelirala z gibljivostjo, progresivno gibljivostjo, preživitveno sposobnostjo, morfološko normalnimi semenčicami in semenčicami z nepoškodovano DNK, ter negativno korelirala z deležem mrtvih semenčic, deležem semenčic z akrosomalno reakcijo in deležem semenčic s poškodovano integriteto membrane semenčic ($P < 0,05$). TNF- α je statistično značilno koreliral s preživitveno sposobnostjo semenčic po treh dneh hranjenja semena ($P < 0,05$). SOD in TNF- α sta zanesljiva pokazatelja kakovosti semena po treh dneh hranjenja. Tako lahko z 92 % zanesljivostjo napovemo, da bo imelo seme, v katerem je vrednost TNF- α izmerjena v sveži semenski plazmi višja od 150 pg/ml, več kot 85 % živih semenčic po treh dneh hranjenja. Z aktivnostjo SOD nižjo kot 1,05 U/ml v sveži semenski plazmi lahko z 88 % zanesljivostjo napovemo, da bo seme po treh dneh hranjenja ustrezalo kriterijem za ustrezne vzorce semena po hranjenju, in kar s 100 % zanesljivostjo, da seme, ki bo imelo aktivnost SOD višjo kot 1,05 U/ml, po treh dneh hranjenja ne bo ustrezno.

Zaključki

Rezultati te raziskave predstavljajo pomemben korak k ugotavljanju novih enostavnih testov, s katerimi bi lahko uspešneje napovedali oploditveno sposobnost hranjenega semena.

Določanje faktorja TNF- α in aktivnosti SOD izmerjenih v sveži semenski plazmi sta se namreč izkazala kot zanesljiva pokazatelja kakovosti semena po treh dneh hranjenja pri 15 – 17 °C in bi torej lahko predstavljala enostaven korak pri presoji ustreznosti merjaščevega semena namenjenega za shranjevanje. Tudi določanje mikroelementov v semenski plazmi dobro korelira s parametri kakovosti semena po treh dneh hranjenja. Glede na to, da je Se koreliral tudi z deležem semenčic z nepoškodovano DNK in deležem semenčic s poškodovano integriteto membrane semenčic, lahko na podlagi merjenja koncentracije Se predvidevamo tudi lastnosti semena, ki jih z običajnimi, rutinskimi testi ne moremo.

Reference

1. Flowers WL. Selection for boar fertility and semen quality – the way ahead. *Reprod Dom Anim* 2011; 46 (2): 55-8.
2. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 2010; 121(1-2): 131-8.
3. Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, et al. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009; 110: 162-71.
4. Lopez Rodríguez A, Rijsselaere T, Beek J, Vyt P, Van Soom A, Maes D. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2013; 59: 5–12.
5. Turba ME, Fantinati P, Bernardini C, Gentilini F, Bacci ML, Forni M. Relationships between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Anim Reprod Sci* 2007; 99(1-2): 72-81.

Biomarkers in seminal plasma as predicting factors for semen quality after storage

In our research we established possibility of predicting boar semen quality after 3 days of liquid storage with oxidative stress parameters (superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAC) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)), trace elements (copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn) and selenium (Se)) present in seminal plasma (Experiment 2) and TNF- α .

SOD activity in seminal plasma on day of semen collection was the only oxidative stress biomarker that significantly correlated with viability and progressive motility after three days of storage. TNF- α also significantly correlated with viability ($P < 0.05$). Among trace elements Se significantly correlated with most of the semen quality parameters after storage ($P < 0.05$).

According to these results evaluation of Se, SOD and, TNF- α in fresh boar seminal plasma can serve as an additional tool in predicting semen quality after storage. Even more, we diagnostically evaluated SOD and TNF- α in fresh seminal plasma as predictors for semen quality outcome on the third day of semen storage and found out that they can be used as a predictor of semen quality after 3 days of storage. These findings contribute to the selection of new biomarker for predicting sperm characteristics in boar semen following storage.

Key words: boar semen; liquid storage; biomarkers