

## СТРАТЕГИИ ЗА ПОДОБРЯВАНЕ НА ОПЛОДИТЕЛНАТА СПОСОБНОСТ НА СПЕРМАТОЗОИДИТЕ ЧРЕЗ НАМАЛЯВАНЕ НИВОТО НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС

Д-р Румяна Давидова, д-р Стилянка Йочкова

*МУ – Плевен, Факултет по медицина, катедра Анатомия, хистология и цитология  
5800, Плевен  
rdavidova@abv.bg*

## STRATEGIES FOR IMPROVING FERTILITY OF SPERMATOZOA BY DECREASING THE LEVEL OF OXIDATIVE STRESS

**Dr Romyana Davidova, Dr Stilyanka Yochkova**

*MU – Pleven, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, histology and cytology  
5800, Pleven*

### ABSTRACT

Oxidative stress (OS) occurs when the production of reactive oxygen species (ROS) exceeds the bodies' own natural antioxidant defenses, which can result in cellular damage. OS is a great concern due to the potential harmful effect of ROS on sperm number, motility, quality and function. The aim of this study is to review the strategies for OS prevention. The modifying life-style habits, usage of antioxidants and prevention of iatrogenic oxidative damage can be applied.

Modifying life-style habits includes stop smoking and avoiding excessive exposure to environmental pollution in working and living conditions.

Two types of antioxidants are used for defense against OS. Prevention antioxidants include metal chelators: transferrin, lactoferrin, and ceruloplasmin, which control lipid peroxidation; DL-penicillamine, 2,3-dimercaptopropan-1 sulphonate and meso-2,3-dimercaptosuccinimic acid enhance the sperm quality during assisted reproductive technique. Scavenger antioxidants include some dietary antioxidants – vitamin C, vitamin E – chain breaking antioxidants, selenium, carotenoids, glutathione, coenzyme Q-10, Zn and Co,  $\alpha$ -lipoic acid.

The use of specific sperm preparation techniques like migration-segmentation, density centrifugation gradient and glass-wool filtration greatly reduce the OS associated with sperm handling and cryopreservation. Adding some antioxidants to the culture media neutralizes ROS and improves spermoocyte fusion.

**Key words:** *reactive oxygen species, sperm fertility, in vitro fertilization, OS prevention*

### Увод

През последните десетилетия нараства броят на мъжете, които имат проблем с оплождането на партньорката си дори и когато фертилния им статус според рутинните изследвания на спермата е нормален. Тези случаи се класифицират като идиопатично безплодие (8). Един на всеки 20 мъже в световен мащаб е засегнат от безплодие (21). Предполага се, че при 30-80% от случаите уврежданията от активни форми на кислорода (ROS) са причина за това (15, 29).

ROS, включващи кислородните йони, свободните радикали и пероксидите, могат да причинят стерилитет по два основни механизма: увреждане на сперматозоидната мембрана, която намалява подвижността им и способността им за сливане с яйцеклетката и директно увреждане спермената ДНК, компроментирайки бащиния ДНК- материал за ембриона (26).

**Целта** на настоящето проучване е систематизиране на основните стратегии за редуциране на OS върху сперматозоидите и с това повишаване на оплодителната им способност.

### Източници на ROS

В еякулата има два основни източника на свободни радикали: **левкоцитите** (неутрофили) и **сперматозоидите**. Левкоцитите са доминиращи в производството на ROS – те произвеждат 1000 пъти повече реактивни остатъци от сперматозоидите. Тъй като производството на ROS е един от главните механизми, чрез които неутрофилите разрушават патогените, не е учудващо, че спермените неутрофили могат да причинят оксидативен стрес (4). Все пак връзката между наличието на спермени левкоцити в еякулата и мъжкото оксидативно безплодие не е напълно изяснена (2).

Способността на **сперматозоидите** да произвеждат ROS е свързана със степента им на зрялост. Незрялата сперма се характеризира с остатъци от цитоплазма в средната част богата на ензима глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа, който контролира нивото на глюкозния ток и вътреклетъчната продукция на  $\beta$ -никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (NADPH) чрез хексозен монофосфатен шънт. NADPH се използва като гориво за производство на ROS от NADPH-оксидазата в мембраната на сперматозоида (12, 15). В резултат тератозооспермените сперматозоиди произвеждат повишено количество ROS в сравнение с морфологично нормалната сперма.

Причина за повишеното ниво на ROS могат да бъдат: увреждания на гръбначния стълб, варикоцеле, левкоцитоспермия, инфекции на пикочо-половия тракт, фактори на околната среда, ятрогенни фактори (4).

### Стратегии за предпазване от OS

- **Промяна на начина на живот**

Пушенето повишава оксидативния стрес в семенната плазма, затова на пациентите се препоръчва отказване от този вреден навик. Изключително важно е също избягване на прекомерното излагане на замърсявания на работното място и в битови условия, тъй като се увеличава увреждането от OS.

- **Антиоксидантите** са основната защита срещу увреждания предизвикани от OS. Различават се предпазни и почистващи антиоксиданти.

**Предпазните (протективни) антиоксиданти** блокират формирането на нови ROS. Метални йони (Fe) могат да генерират високо реактивни хидроксилни радикали ( $\cdot\text{OH}$ ), които предизвикват липидна пероксидация.

**Металните хелатори** – трансферин, лактоферин и церулоплазмин – контролират липидната пероксидация в спермалната плазмена мембрана, запазвайки целостта ѝ (23).

Други метални хелатори като етилен диамин тетраоцетна киселина, 1,10-фенантролин и невопроин намаляват увреждането на спермената ДНК при риби (7). *In vitro* суплементацията с метални хелатори като DL-пенициламин, 2,3-димеркаптопропан-1 сулфонат и мезо-2,3-димеркапто-секциниламидна киселина подобряват качеството на спермата по време на асистирани репродуктивни техники (4).

**Почистващите (скавенджирани) антиоксиданти** премахват ROS, които вече са произведени.

Хранителните антиоксиданти – плодове, зеленчуци и различни хранителни добавки са потенциален източник за антиоксиданти.

**Vit. C** е представен в екстрацелуларната течност. Той неутрализира хидроксилните, супероксидните и водороден пероксидни радикали и предпазва от спермена аглутинация (3). Допълнително вит.С помага за рециклирането на вит.Е (22). Препоръчват се 60 mg дневно Vit. C и 50-800 mg дневно Vit. E. Вит.С се намира в редуцирано състояние в семенната плазма на безплодни мъже (17) и повишава броя на сперматозоидите при дневен прием 200-1000 mg (9).

**Vit. E** е представен в клетъчната мембрана. Той неутрализира  $H_2O_2$  и така предпазва плазмената мембрана от липидна пероксидация. В дневна доза 600 mg той подобрява сперматозоидните функции оценявани по зона-свързващия тест (27).

**Селенът** е задължителен компонент за синтеза на глутатион пероксидазата. Каротиноиди и селен в синергизъм с Vit. E са в препоръчителна доза 1000 до 70 микрограма респективно (5).

**Каротиноидите** като  $\beta$ -каротин и ликопен са важни компоненти на антиоксидантната защита (12).  $\beta$ -каротините предпазват плазмената мембрана от липидната пероксидация. Ликопенът се намира в изобилие в домати (1). Той е 2 пъти по-мошен от  $\beta$ -каротин и 10 пъти по-мошен от вит. E в очистване на свободния  $O_2$  и инхибирането на липидната пероксидация в серумната плазма (10).

**Глутатионът** е най-широко разпространеният антиоксидант в човешкото тяло. Глутатионовата терапия значително повишава мотилитета на сперматозоидите у безплодни мъже след двумесечно прилагане в доза 600 mg мускулно (4).

**Коензим Q-10** (CoQ-10) се открива в средната част на сперматозоида, рециклира вит. E и предпазва от прооксидантната му активност. Свързан е с продукцията на енергия. CoQ-10 намалява продукцията на  $H_2O_2$  в семенната течност и семенната плазма. Приложен в доза 50  $\mu$ M CoQ-10 значително повишава мотилитета, а в доза 60  $\mu$ M при *in vitro* суплементация повишава нивото на оплождане (16, 24).

**Zn и Cu** са метали, които са ко-фактори за изграждането на супероксидната дисмутаза – ключов ензимен антиоксидант. Средният дневен прием в САЩ е 12.3 mg Zn и 900  $\mu$ g Co. При предозиране тези метали могат да доведат до образуване на ROS (20).

**$\alpha$ -липоева киселина** претърпява редукция и образува дихидролипоева киселина, която регенерира други антиоксиданти като вит. C и E и редуцира глутатиона чрез редукционни цикли (6).

**Карнитините** са хранителни антиоксиданти, които намаляват ROS чрез изхвърляне на излишния интрацелуларен токсин ацетил коензим A, който е отговорен за митохондриалната продукция на ROS. Те подобряват спермалния мотилитет (3,28).

#### • Предпазване от ятрогенния OS

Техниките за изолиране на сперматозоиди като миграция-сегментация, високочестотно центрифугиране и филтриране през стъкло и вълна значително намаляват нивата на ROS чрез премахване на левкоцитите (4).

*In vitro* суплементацията използвана при подготвяне на спермата и асистираната репродукция, предпазват сперматозоидите от ROS. Добавянето на антиоксиданти в културалната среда неутрализира ROS, продуцирани от левкоцитите и незрелите сперматозоиди и подобрява спермалното сливане (14). Глутатионът и хипотаурина предпазват сперматозоидите от оксидативното увреждане причинено от  $H_2O_2$  (11). Пентоксифилинът – дериват на метилксантина - инхибира фосфодиестеразата. Той има положителен ефект върху подвижността и акрозомната реакция и редуцира супероксидния анионен радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) произвеждан от човешките сперматозоиди (2). N-ацетил- L-цистеин – прекурсор на глутатиона – редуцира ROS, както и ROS- индуцираното увреждане на ДНК (4).

**В заключение**, промяната в начина на живот, предпазването от ятрогенния OS и прецизното използване на антиоксиданти, включително и при *in vitro* процедурите, може да даде нови насоки в борбата с мъжкия стерилитет.

#### Библиография

1. Agarwal S, Rao AV, 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. Canadian Medical Association Journal, 163, 739-744.

2. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM, 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprodu Biomed Online*, 8, 616-27.
3. Agarwal A, Said TM, 2004. Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online*, 8, 376-384.
4. Agarwal A, Sushil A, Prabakaran A, Said TS, 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology*, 26(6), 65-77.
5. Bartfay WJ, Hou D et al, 1998. The synergetic effects of vitamin E and selenium in iron-overloaded mouse hearts. *Canadian Journal of Cardiology*, 14, 937-941.
6. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A, 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*, 29, 315-331.
7. Bruskov VI, Malakhova LV et al, 2002. Heat –induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acid Research*, 30, 1354-1363.
8. Cocuzza M, Sikka CS, Athayde KS, Agarwal A, 2007. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol*, 33(5), 603-621.
9. Dawson EB, Harris WA, Rankin WER et al, 1987. Effect of ascorbic acid on male fertility. *Ann N Y Acad Sci*, 498, 312-323.
10. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H, 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, 247, 535-538.
11. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE, 2000. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, 15, 61-68.
12. Fisher H, Aiken R, 1997. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool*, 277, 390-400.
13. Gupta NP, Kumar R, 2002. Lycopene therapy in idiopathic male infertility – a preliminary report. *Int Urol Nephrol*, 34, 369-372.
14. Irwine DS. Glutathione as a treatment for male infertility, 1996. *Rev Reprod*, 1, 6-12.
15. Iwasaki A, Gagnon C, 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*, 57, 409-416.
16. Kunzle R, Mueller MD et al, 2003. Semen quality of male smokers in infertile couples. *Fertil Steril*, 79, 287-291.
17. Lewin A, Lavon H, 1997. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med*, 18(suppl), S213-S219.
18. Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W, 1997. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, 67, 142-147.
19. Lloyd DL, Carmichael PL, Phillips DH, 1998. Comparison of the formation of 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem Res Toxicol*, 11, 420-427.
20. Maruyama DK Jr, Hale RW, Rigers BJ, 1995. Effects of white blood cells on the in vitro penetration of zona-free hamster eggs by human spermatozoa. *J Androl*, 6, 127-135.
21. Mc Lachlan R, de Crestner D, 2001. Male infertility: The case for continued research. *MJA*, 174, 116-117.
22. Sies H, Stahl W, Sundquist AR, 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 669, 7-20.
23. Sanocka D, Kuprisz M, 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 12-19.
24. Thomas SR, Neuzil J, Stocker R, 1996. Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of alpha-tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16, 687-696.

25. Traber MG, van der Vliet A, Reznick AZ, Cross CE, 2000. Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation? *Clin Chest Med*, 21, 173-191.
26. Tremellen K, 2008. Oxidative stress and male infertility. – a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3), 243-258.
27. Verma A, Kanwar KC, 1999. Effect of vit. E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl*, 1, 151-154.
28. Vicari E, Calogero AE, 2001. Effects of treatment with carnitines in infertile patient with prostate-vesicular epididymitis. *Hum Reprod*, 16, 2338-2342.
29. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C, 1993. Reactive oxygen species in semen in infertile patients: levels of supraoxide dismutase- and catalase-like activity in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*, 16, 183-188.