

*Opšti pregledi /
General reviews*

ISPITIVANJE UTICAJA EGZOGENIH
FAKTORA NA FLUIDNOST ČELIJSKE
MEMBRANE SPERMATOZOIDA I
KONCENTRACIJU SLOBODNIH RADIKALA
(TIOLA I ASKORBIL-RADIKALA) U
SEMENOJ TEČNOSTI KOD PACIJENATA SA
NARUŠENIM KVALITETOM
SPERMOGRAMA

EXAMINING THE IMPACT OF EXOGENOUS
FACTORS ON THE FLUIDITY OF SPERM
CELL MEMBRANES AND THE
CONCENTRATION OF FREE RADICALS
(THIOLS AND ASCORBYL RADICALS) IN
SEMINAL FLUID IN PATIENTS WITH
IMPAIRED SEMEN QUALITY

Correspondence to:

Tamara Živić

Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski
fakultet;
Specijalna bolnica za ginekologiju sa
porodilištem "Jevremova" Medigroup,
Beograd
e-mail: zivictamara175@gmail.com.rs
tel.: 065 2333 781

Tamara Živić^{1,2}, Eliana Garalejić², Strahinja Križak²,
Aleksa Radivojević², Artur Bjelica^{1,3}

¹ Medicinski fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad,
Srbija

² Specijalna bolnica za ginekologiju sa porodilištem „Jevremova“,
Beograd, Srbija

³ Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Univerzitetski klinički centar
Vojvodine, Novi Sad, Srbija

Ključne reči

spermatozoid, slobodni radikal, oksida-
tivni stres, polinezasićene masne kiseline
(PUFA), fluidnost, glutation, askorbinska
kiselina.

Key words

spermatozoon, free radical, oxidative
stress, polyunsaturated fatty acids
(PUFA), fluidity, glutathione, ascorbic
acid.

Sažetak

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO-SZO), stopa infertilnosti je u stalnom porastu. Ovo je naročito izraženo u kategoriji muškaraca mlađe životne dobi što je veoma važno, jer su kvalitet sperme i muški fertilitet bitni pokazatelji, ne samo reproduktivnog, već opšteg zdravlja organizma. Cilj ovog preglednog rada je da se utvrdi povezanost i značaj pojedinačnih faktora koji dovode do povećane koncentracije slobodnih radikala (tj. oksidativnog stresa) i narušavaju kvalitet spermograma kao i njihov uticaj na fluidnost čelijske membrane spermatozoida. Rana i pravovremena detekcija slobodnih radikala je od presudnog značaja za homeostazu čitavog organizma. Adekvatna fluidnost membrane spermatozoida je neophodna za njihovu pokretljivost i za fuziju spermatozoida sa jajnom ćelijom. Za održavanje homeostaze organizma neophodni su i antioksidanti. Glutation i askorbinska kiselina su neenzimski antioksidanti, gde se nakon njihove primene beleže bolji nalazi spermograma.

UVOD

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO-SZO), stopa infertilnosti je u stalnom porastu. Ovo je naročito izraženo u kategoriji muškaraca mlađe životne dobi što je veoma važno, jer su kvalitet sperme i muški fertilitet bitni pokazatelji, ne samo reproduktivnog, već opšteg zdrav-

lja organizma. Spermatozoidi su muške polne haploidne ćelije koje nastaju u procesu spermatogeneze. Iako su morfološki diferencirani, i dalje nemaju sposobnost prepoznavanja i oplodnje jajne ćelije. Spermatozoidi funkcionalnost stiču nizom događaja koji se dešavaju tokom njihovog prolaska kroz muški i ženski genitalni trakt. Svi ovi događaji su

neophodni da bi došlo do fuzije sa jajnom ćelijom i procesa oplodnje.

Cilj ovog preglednog rada je da se utvrdi povezanost i značaj pojedinačnih faktora koji dovode do povećane koncentracije slobodnih radikala (tj. oksidativnog stresa) i narušavaju kvalitet spermograma kao i njihov uticaj na fluidnost ćelijske membrane spermatozoida. Takođe cilj je ukazati i na određene mane i nedostatke korišćenih publikacija radi poboljšanja tretmana pacijenata sa ovim problemom.

Citoplazmatska membrana spermatozoida i slobodni radikali

Važnu ulogu u dostizanju funkcionalnosti spermatozoida ima plazma membrana. Ona nije samo granica ćelije, već je jedna veoma dinamična struktura, semipermeabilna i fluidna. Stepenn fluidnosti zavisi od nekoliko faktora uključujući sastav lipida (pre svega masnih kiselina- koji su najosetljiviji makromolekuli u ćelijskoj membrani) kao i temperaturu kojoj je membrana izložena. Po definiciji, slobodni radikal kiseonika ili reaktivna vrsta kiseonika (ROS) je bilo koje hemijsko jedinjenje sa jednim ili više nesparenih elektrona. ROS su u stanju da napadaju polinezasićene masne kiseline koje se nalaze u sastavu membrane (PUFA), menjajući njihovu strukturu, funkciju i permeabilnost. Spermatozoidi su jako podložni oštećenjima slobodnih radikala kiseonika (ROS) zbog prisustva velike količine polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u ćelijskoj membrani i niskih koncentracija antioksidanata unutar citoplazme. Ovakva stanja dovode do povećane lipidne peroksidacije, koja dovodi do oksidativnog stresa a on je poznat kao uzročnik muške neplodnosti zbog štetnih efekata koje ima na sazrevanje polnih ćelija. Osetljivost PUFA prema lipidnoj peroksidaciji (LPO) raste sa povećanjem broja dvostrukih veza, gde je krajnji proizvod lipidne peroksidacije malondialdehid (MDA). MDA se često koristi za praćenje stepena peroksidativnog oštećenja spermatozoida. Lipidna peroksidacija bioloških membrana uzrokuje smanjenu funkcionalnost membrane, smanjenu fluidnost, nižu vrednost membranskog potencijala kao i povećanu propustljivost za nespecifične jone⁽¹⁻³⁾. Održavanje fluidnosti membrane je jako važno jer je ona neophodna za pokretljivost spermatozoida i za fuziju spermatozoida sa jajnom ćelijom. Ova publikacija dokazuje tvrdju da kod pacijenata sa narušenim nalazom spermograma je primećen znatno veći udeo holesterola u plazma membrani koji dovodi do smanjene hidratacije i oštećenja fosforilacije tirozina što ima za posledicu smanjenu pokretljivost i nemogućnost pravilne oplodnje jajne ćelije⁽⁴⁻⁶⁾.

U fiziološki normalnim granicama slobodni radikali su neophodni za dostizanje funkcionalnosti spermatozoida. Glavni uzročnici ROS-a u spermiji su: nezrele ili abnormalne forme spermatozoida i subpopulacija leukocita poznata kao polimorfonuklearni neutrofilni (PMN). Spermatozoidi su bogati mitohondrijama, jer su one važan izvor energije za pokretljivost. Produkcija ROS-a je znatno veća u oštećenim mitohondrijama, gde dolazi do mitohondrijalne disfunkcije u spermatozoidima. Oksidativna oštećenja mogu da izazovu degradaciju baza DNK i fragmentaciju DNK. Spermatozoidi sa oštećenom DNK gube sposobnost da oplode jajnu ćeliju.

Kada je oštećenje DNK malo, spermatozoidi i jajna ćelija mogu da poprave mala oštećenja DNK. Ukoliko je DNK oštećena u velikoj meri dolazi do apoptoze i fragmentacije embriona. Stepenn oštećenja DNK spermatozoida zavisi od prirode i količine ROS-a, vremenu izlaganja, uticaju ROS-a, kao i vanćelijskim faktorima kao što su temperatura, tenzija kiseonika i sastav okolnog okruženja (joni, proteini i antioksidanti)⁽⁷⁻⁹⁾.

Antioksidanti

Ravnoteža između proizvodnje i uklanjanja slobodnih radikala je od suštinskog značaja za homeostazu organizma. Semena plazma je osnovna zaštita spermatozoida od ROS-a, jer spermatozoidi sadrže malo citoplazme, pa su manje efikasni u zaštiti od ROS-a. Podjednako važni za održavanje homeostaze organizma su antioksidanti, koji su najviše zastupljeni u semenoj plazmi. Njihova uloga je uklanjanje prekomerne koncentracije slobodnih radikala. Antioksidanti se dele na dve kategorije: endogene i egzogene. Antioksidanti su smešteni uglavnom u središnjem delu spermatozoida, području sa malom količinom citoplazme i u tečnostima akcesornih polnih žlezda. Spermatozoidi zavise i od vanćelijske antioksidativne zaštite, koja je u interakciji s biohemijskim sastojcima semene plazme^(7, 8).

Askorbil radikal je glavni hidrofilni antioksidant koji je rastvorljiv u vodi. Luči se iz semenih vezikula, njegova koncentracija je 10 puta veća u semenoj plazmi u odnosu na krvnu plazmu. Vitamin C uklanja ROS unutar ćelije ali i u vanćelijskom prostoru, pa je s toga jedan od najznačajnijih antioksidanata u plazmi sa brojnim antioksidativnim ali i drugim ulogama^(7, 8, 10). U publikaciji gde je praćen uticaj askorbinske kiseline na redukciju MDA, ispitanici su bili podeljeni u dve grupe: normozoospermični i oni sa abnormalnim nalazom spermograma. Koncentracija MDA je praćena putem tiobarbiturne kiseline (TBA). Primećeno je da nakon inkubacije sa askorbil radikalom dolazi do povećane pokretljivosti, vijabilnosti i smanjene DNK fragmentacije i MDA ali se nije dogodila povećana akrozomska reakcija. U sledećoj publikaciji praćena je koncentracija askorbil radikala (AA-) u odnosu na parametre fertilitet i pušenje. Fertilni nepušači imaju najviše vrednosti askorbil radikala, zatim fertilni pušači, potom nefertilni nepušači i najniže vrednosti su primećene kod nefertilnih pušača. Pronađena je korelacija između visokih vrednosti AA- i morfološki urednih spermatozoida⁽¹¹⁻¹²⁾.

Glutation (GSH) je najznačajniji neenzimski ćelijski tiolni antioksidant male molekulske mase. Osim svojih biohemijskih funkcija, glutacion može ukloniti ROS, pa je zato jako važan antioksidant. Glutation ima značajnu ulogu u spermatogenezi i sazrevanju spermatozoida. Glutation i selen igraju ključnu ulogu u formiranju enzima koji se nalazi u spermatidama i formiraju deo u središnjem delu zrelog spermatozoida. Nedostatak glutaciona dovodi do nestabilnosti središnjeg dela i dovodi do slabije pokretljivosti. Glutation može da obnovi nedostatak PUFA u ćelijskoj membrani^(8-9,14). U publikaciji u kojoj je praćena koncentracija glutaciona, cinka i MDA, došlo se do sledećih zaključaka: GSH i cink su bili pozitivno korelisani sa pokretljivošću i sa ukupnom koncentracijom spermatozoida.

Visoke vrednosti MDA i lipidne peroksidacije su primećene kod grupa sa abnormalnim nalazom spermograma. U sledećoj publikaciji praćen je uticaj glutaciona nakon korišćena 6 meseci. Primećene su zanačajne razlike u pokretljivosti, morfologiji i ukupnoj koncentraciji spermatozoida u odnosu na netretiranu placebo grupu. Primećeno je da glutation ne dovodi do povećanja volumena sperme. Moramo napomenuti da je glutation snažan antioksidant u borbi protiv muške neplodnosti, ali mora se konzumirati u dovoljno dugom vremenskom intervalu i u dovoljnim koncentracijama da bi ispoljio svoj efekat⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Koncentracija odabranih slobodnih radikala i fluidnost ćelijske membrane spermatozoida u navedenim publikacijama merena je putem hemiluminiscencije. Hemiluminiscencija je direktna metoda koja ne razlikuje ROS na ekstracelularnom i intracelularnom nivou. U narednim istraživanjima metoda prvog izbora bi bila elektron-paramagnetna rezonanca (EPR), koja pravi jasnu razliku između intracelularnog i ekstracelularnog ROS-a⁽¹⁷⁾.

Uticaj duvanskog dima

U ovom preglednom radu smo posmatrali uticaj duvanskog dima na nalaz spermograma. Duvanski dim sadrži više od 7000 hemikalija gde pušači imaju veću izloženost tim opasnim supstancama. Velika meta-analiza koja je obuhvatila kategorije pušača i nepušača, zaključila je da je pušenje cigareta negativno korelisano sa koncentracijom, brojem,

pokretljivošću i morfologijom spermatozoida kao i mutacijama određenih kontrolnih tačaka koje kontrolišu ispravku DNK. Utvrđeno je da je pad kvaliteta spermograma izraženiji kod teških pušača u odnosu na kategorije umerenih i blagih pušača. Mutacije kontrolnih tačaka dovode do povećane apoptoze i smanjuju kvalitet sperme. Dakle, opšti efekat pušenja cigareta na plodnost muškarca može biti rezultat kombinovanih uloga povišenog oksidativnog stresa, oštećenja DNK i ćelijske apoptoze⁽¹⁸⁾.

Testove za procenu oksidativnog stresa bi trebalo uvrstiti u svakodnevnu praksu u dijagnostici muške neplodnosti.

ZAKLJUČAK

U tretmanu muške neplodnosti neophodan je izbor testa za procenu uticaja oksidativnog stresa koji je primeren aktuelnoj kliničkoj praksi, sa visokim stepenom pouzdanosti i validnosti. U narednim publikacijama prva metoda izbora bi bila EPR, koja je najdirektnija i najmanje dvosmislena metoda za detekciju slobodnih radikala. Pored toga, neophodno je kombinovanje sa drugim testovima poput DNK fragmentacije i MAR testa, da bi se dobili što pouzdaniji podaci. Od izrazitog značaja je primena evaluacije i testiranja tokom svih faza upotrebe medikamentozne terapije i promene životnih navika, kao i nakon toga.

Abstract

According to data from the World Health Organization (WHO), the rate of infertility is constantly increasing. This is particularly evident among younger men, which is significant because sperm quality and male fertility are important indicators of not only reproductive but also general health. The aim of this review article is to determine the correlation and significance of individual factors that lead to increased concentrations of free radicals (i.e., oxidative stress) and impair semen quality, as well as their impact on the fluidity of sperm cell membranes. Early and timely detection of free radicals is crucial for the homeostasis of the entire organism. Adequate membrane fluidity of sperm is necessary for their motility and for the fusion of sperm with the egg cell. Antioxidants are also essential for maintaining the homeostasis of the organism. Glutathione and ascorbic acid are non-enzymatic antioxidants, and their application results in improved semen quality.

LITERATURA

1. CJones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 1998;53:73-84.
2. Hammadeh M, Hamad F. M, Filipos A. A. Reactive Oxygen Species and Antioxidant in Seminal Plasma and Their Impact on Male Fertility. *Internation Journal of Fertility and Sterility.* 2009;3(3):87-110.
3. Martines A, Morros A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci.* 1996;1(1):103-117.
4. Buffone G. M, Doncel F. G, Calamera C. J, Verstraeten V. S. Capacitation-associated changes in membrane fluidity in asthenozoospermic human spermatozoa. *Int J Androl.* 2009;32(4):360-75.
5. Buffone G. M, Verstraeten V. S, Calamera C. J, Doncel F. G. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl.* 2009;30(5):552-8.
6. Force A, Grizard G, Giraud M. N, Motta C, Sion B, Boucher D. Membrane fluidity and lipid content of human spermatozoa selected by swim-up method. *Int J Androl.* 2001;24(6):327-34.
7. Hammadeh M, Hamad F. M, Filipos A. A. Reactive Oxygen Species and Antioxidant in Seminal Plasma and Their Impact on Male Fertility. *Internation Journal of Fertility and Sterility.* 2009;3(3):87-110.
8. Agarwal A, Parabakaran A. S. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2005;43(11):963-74.
9. Oborna I, Fingerova H, Novotny J, Brezinova J, Svobodova M, Aziz N. Reactive oxygen species in human semen in relation to leukocyte contamination. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153(1):53-7.
10. Das P, Choudhari A. R, Dhawan A, Singh R. Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms. *Indian J Clinic Biochem.* 2009;24(3):312-5.
11. Fanaei H, Khayat S, Halvaei I, Ramezani V, Azizi Y, Kasaeia A, et al. Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *Iran J Reprod Med.* 2014;12(2):103-10.
12. Colagar H. A, Marzony T. E. Ascorbic Acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem Nutr.* 2009;45(2):144-9.
13. Irvine D S. Glutathione as treatment for male infertility. *Rev Reproduction.* 1996;1(1):6-12.
14. Alkumait M. H, Abdul-Aziz M. M, Nima H. M. The Effect of Glutathione versus Co-Enzyme Q10 on Male Infertility Original Study. *Medico Legal Update.* 2020;20(1):409-414.
15. Atig F, Raffa M, Habib B. A, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urol.* 2012;12:6.
16. Radonjic V, Petrovic J. Korelacija između koncentracije cinka u sjemenoj plazmi i serumu. *MD-Medical Data.* 2015;7(2):127-131.
17. Agarwal A, Howards S. S, Niederberger C. S, Deepinder F. Determination of seminal oxidants (reactive oxygen species). Cambridge University Press. 2010;39.
18. Kumar N, Singh A. K. Impact of environmental factors on human semen quality and male fertility: a narrative review. *Environmental Sciences Europe.* 2022;34(1).