

Received: 2005.07.19  
Accepted: 2005.10.11  
Published: 2005.11.03

## System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników

### The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa

**Monika Frączek, Maciej Kurpisz**

Institut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

#### Streszczenie

Badania epidemiologiczne dotyczące niepłodności męskiej donoszą o nasileniu występowania tzw. niepłodności idiopatycznej, w której nie można w sposób jednoznaczny wskazać przyczyny braku prokreacji. Ostatnio dużą uwagę poświęca się reakcjom oksydo-redukcyjnym, które mogą mieć znaczący udział w etiopatogenezie niepłodności. Każda żywa komórka jest zdolna do wytwarzania reaktywnych form tlenu, takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, tlen singletowy czy nadtlenek wodoru. Cecha ta dotyczy również męskich komórek rozrodczych. Pewne ilości reaktywnych metabolitów tlenowych, powstające w warunkach fizjologicznych w łańcuchu oddechowym, są niezbędne do zachowania prawidłowej funkcji plemników. W wyniku nadmiernego wytwarzania RFT lub wyczerpania możliwości kompensacyjnych układu antyoksydacyjnego w nasieniu, dochodzi do stresu oksydacyjnego. Długotrwała ekspozycja plemników na RFT jest przyczyną zmian peroksydacyjnych w lipidach błon komórkowych plemników, ma niekorzystny wpływ na strukturę receptorów błonowych, białek enzymatycznych i transportowych oraz zwiększa poziom fragmentacji plemnikowego DNA. Praca jest próbą podsumowania wiedzy dotyczącej układu redoks w nasieniu męskim i skutków działania stresu oksydacyjnego na funkcje plemników.

#### Słowa kluczowe:

reaktywne formy tlenu • antyoksydanty • stres oksydacyjny • nasienie • uszkodzenia peroksydacyjne

#### Summary

Epidemiologic studies on male infertility suggest that many cases should be considered idiopathic infertility, that is an exact cause of the inability to induce conception cannot be identified. Recently it was found that the redox status within the male gamete or in the semen can be at least partly responsible for the etiology of infertility. Each living cell is capable of producing reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen, or hydrogen peroxide. This process involves the male germ cells as well. A certain amount of free radicals generated in the respiratory chain is necessary for the normal function of sperm cells. In cases of overproduction of ROS, the antioxidant potential of sperm cells can be exhausted and oxidative stress may develop. Prolonged exposure of sperm cells to ROS may cause peroxidation of the cell membrane lipids, alter the structure of protein receptors, enzymes, and transporter proteins, and affect sperm DNA fragmentation. This review aims to summarize the current state of knowledge regarding the redox system in male sperm and the consequences of oxidative stress on semen quality and sperm cell function.

#### Key words:

reactive oxygen species • antioxidants • oxidative stress • semen • peroxidative damage

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/8377.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8377.pdf)**Word count:** 5914**Tables:** –**Figures:** 1**References:** 84**Adres autora:** prof. dr hab. Maciej Kurpisz, Instytut Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań; e-mail: kurpimac@man.poznan.pl**Wykaz skrótów:** **ATP** – adenosynotrójfosforan; **cAMP** – cykliczny adenosynomonofosforan; **DHA** – kwas dokozaheksanowy; **DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy; **mtDNA** – mitochondrialny kwas deoksyrybonukleinowy; **DPI** – jodonian dwufenyloowy; **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy, postać utleniona; **FasL** – ligand receptora Fas; **FMLP** – n-formylo-metyonylo-leucylo-feniloalanina; **FMN** – mononukleotyd flawinowy, postać utleniona; **GPx** – peroksydaza glutationowa; **GR** – reduktaza glutationowa; **GSH** – zredukowany glutation; **GSSG** – utleniony glutation (dwusiarczek glutationu); **LPO** – peroksydacja lipidów; **MDA** – dialdehyd malonowy; **MPO** – mieloperoksydaza; **NAD** – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, postać utleniona; **NADH** – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, postać zredukowana; **NADPH** – fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego, postać zredukowana; **NOS** – syntaza tlenu azotu; **PKA** – kinaza białkowa A; **PLA<sub>2</sub>** – fosfolipaza A<sub>2</sub>; **PMA** – 12-mirystynian, 13-octan forbolu; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa; **Cu,ZnSOD** – cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa; **MnSOD** – mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa; **EC-SOD** – pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa; **TBA** – kwas tiobarbiturowy; **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu-alfa; **WKT** – wielonienasycone kwasy tłuszczowe; **ZP** – osłonka przejrzysta**Wykaz symboli:** **B<sup>•</sup>** – rodnik białkowy; **BH** – łańcuch boczny białka; **BOO<sup>•</sup>** – białkowy rodnik nadtlenkowy; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – nadtlenek wodoru; **HOCl** – kwas podchlorawy; **L** – rodnik lipidowy; **LH** – łańcuch boczny kwasu tłuszczowego; **LOO<sup>•</sup>** – lipidowy rodnik nadtlenkowy; **LOOH** – nadtlenek kwasu tłuszczowego; **NO<sup>•</sup>** – tlenek azotu; **NO<sub>2</sub>** – dwutlenek azotu; **<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** – tlen singletowy; **O<sub>2</sub>** – tlen cząsteczkowy; **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – anionrodnik ponadtlenkowy; **OH** – rodnik hydroksylowy; **ONOO<sup>-</sup>** – nadtlenoazotyn; **RNCl<sub>2</sub>** – dwuchloraminy; **RNH<sub>2</sub>** – związki z grupą aminową; **RNHCl** – chloraminy; **-SH** – grupa sulfhydrylowa; **-S-S-** – mostek dwusiarczkowy

## 1. SYSTEM REDOKS W NASIENIU

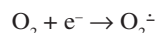
W ostatnich latach, reaktywne formy tlenu (RFT) są niezwykle popularnym i chętnie uwzględnianym czynnikiem, w wyjaśnianiu patomechanizmu wielu jednostek chorobowych. W badaniach nad niepłodnością małżeńską często opisywane są przypadki tzw. niepłodności idiopatycznej, w których nie można w sposób jednoznaczny wskazać przyczyny niepowodzenia w rozrodzie. Standardowa analiza nasienia nie dostarcza informacji, koniecznych do określenia stanu płodności mężczyzny. W związku z tym, duże nadzieje wiąże się z dokładnym rozpoznaniem procesów biochemicznych zaangażowanych w złożony proces zapłodnienia, a do nich z pewnością należą układy pro- i antyoksydacyjne, które warunkują prawidłowy metabolizm plemników.

### 1.1. Reakcje wolnorodnikowe w układach biologicznych

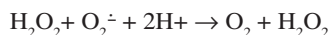
Rodzina RFT obejmuje liczną grupę produktów jedno-, dwu- i trójelektronowej redukcji cząsteczki tlenu (O<sub>2</sub>) oraz tlen singletowy (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Znajdują się wśród nich tzw. wolne rodniki, czyli atomy lub cząsteczki, zdolne do samodzielnego istnienia, mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na orbicie zewnętrznej, a także nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), kwas podchlorawy (HOCl) czy tlenek azotu (NO<sup>•</sup>). Powstają one w przebiegu reakcji wolnorodniko-

wych, zazwyczaj nieodwracalnych, z których wiele stanowi element komórkowych szlaków metabolicznych.

Rodnikiem wyjściowym, formowanym podczas jednoelektronowej redukcji cząsteczkowego tlenu jest anionrodnik ponadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

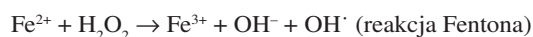


Reakcja ta jest dalej kontynuowana *in vivo* i bezpośrednio związana z metabolizmem tlenowym komórki. Obecność O<sub>2</sub><sup>-</sup> w żywej komórce nieuchronnie prowadzi do tworzenia następnych jego reaktywnych form, o zwiększonej reaktywności. W obecności protonów, O<sub>2</sub><sup>-</sup> jest zdolny do spontanicznej lub enzymatycznej (katalizowanej przez enzym dysmutazę ponadtlenkową – SOD) dysmutacji, do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>.

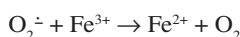


H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> występuje w dużych stężeniach w aktywowanych komórkach fagocytarnych, w czasie tzw. wybuchu tlenowego, ale jego obecność jest również stwierdzona w plemnikach. Ten względnie stabilny, choć elektrycznie obojętny związek może łatwo dyfundować przez błony komórkowe. Właściwość ta zwiększa jego toksyczność w stosunku do gamet męskich. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> choć sam nie jest rodnikiem, łatwo ulega przekształceniu w taką postać. W systemach

biologicznych,  $H_2O_2$  łatwo wchodzi w reakcje z metalami przejściowymi, takimi jak żelazo, miedź, kobalt, mangan czy chrom (w reakcji Fentona) oraz z  $O_2^{\cdot-}$  (w reakcji Habera-Weissa). Produktem obu tych reakcji jest rodnik hydroksylowy ( $OH^{\cdot}$ ) o bardzo silnych właściwościach utleniających.

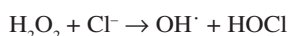


Czynnikiem limitującym tę reakcję jest dostępność jonów żelazawych ( $Fe^{2+}$ ). Są one regenerowane przez sam  $O_2^{\cdot-}$  za pośrednictwem redukcji.



Reduktorami tej reakcji mogą być również takie substancje, jak askorbinian, NADPH, zredukowany glutation, cysteina lub grupy tiolowe białek. W reakcjach tych,  $Fe^{2+}$  czy  $Cu^{2+}$  pełnią rolę katalityczną, co sprawia, że zachodzą one nawet przy ich bardzo małych stężeniach. Dlatego organizm dysponuje wieloma mechanizmami, umożliwiającymi silne wiązanie jonów metali przejściowych z białkami. W plazmie nasiennej, żelazo i miedź mogą występować w stanie wolnym i w ten sposób podtrzymywać stres oksydacyjny [49].

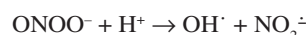
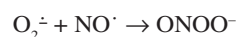
Powyższe reakcje wyjaśniają mechanizm tworzenia najbardziej niebezpiecznej RFT w układach biologicznych, tj. rodnika hydroksylowego. Okres trwania  $OH^{\cdot}$  wynosi około  $10^{-11}$  sekundy. Reaguje on z ogromną szybkością w miejscu powstania z pierwszą cząsteczką organiczną lub jonem metalu, które napotka na swej drodze. Ta właściwość czyni go bardzo szkodliwą cząsteczką, nawet dla samej zaktywowanej komórki fagocytarnej. Duże ilości  $OH^{\cdot}$  powstają w leukocytach zdolnych do fagocytozy w czasie wybuchu oddechowego, w reakcji katalizowanej przez enzym mieloperoksydazę (MPO).



W stanie zapalnym, MPO obecna w fagocytach, utlenia jony chlorkowe, przy współdziałaniu  $H_2O_2$  do HOCl, o silnym potencjale oksydacyjnym. Kwas ten może reagować z wieloma związkami zawierającymi grupy aminowe ( $RNH_2$ ) do chloramin ( $RNHCl$ ) i dwuchloramin ( $RNCl_2$ ), które zachowują właściwości utleniające. HOCl jest silnym utleniaczem, utleniającym grupy sulfhydrylowe ( $-SH$ ) białek i związków niskocząsteczkowych do dwusiarczków lub kwasów sulfonowych. Reaguje również z resztami nienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów i z cholesterolem.

Część tlenu cząsteczkowego podlega reakcji tworzenia tlenu singletowego ( $^1O_2$ ). Tlen singletowy nie jest wolnym rodnikiem, ale energia jego cząsteczki jest dużo większa, niż energia tlenu w stanie trypletowym. W ten sposób może on oddziaływać z innymi cząsteczkami, przekazując im swoją energię wzbudzenia. Przyłącza się do wiązań podwójnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WKT), powodując powstawanie nadtlenków tych lipidów bez pośrednictwa reakcji wolnorodnikowej. Reaguje też z resztami aminokwasów białek (najbardziej podatne są reszty histydyny i metioniny) oraz z kwasami nukleinowymi (głównie z purynami).

Innym rodnikiem, tworzonym w układach biologicznych, w wyniku reakcji metabolicznych, jest tlenek azotu ( $NO^{\cdot}$ ). Jest on wytwarzany przez syntezę z L-argininy z udziałem syntazy tlenu azotu (NOS). Kofaktorami tej reakcji są NADPH, FMN, FAD, kalmodulina i wapń. Syntazy  $NO^{\cdot}$  należą do dwóch grup. Jedna obejmuje formy zależne od jonów wapnia i od białka pośredniczącego w wielu oddziaływaniach jonów wapnia – kalmoduliny (cNOS), druga zaś, to formy niezależne od kalmoduliny i wapnia (iNOS).  $NO^{\cdot}$  reguluje wiele funkcji w męskim układzie rozrodczym, a od 1996 roku wiadomo, że może być również generowany w plemnikach [52].



$NO^{\cdot}$  może wchodzić w reakcje z  $O_2^{\cdot-}$ , tworząc nadtlenoazotyn ( $ONOO^-$ ). Ta reakcja ma duże znaczenie biologiczne i prowadzi do unieczynnienia  $O_2^{\cdot-}$  i  $NO^{\cdot}$ . Jednak powstały  $ONOO^-$ , który sam nie jest rodnikiem, może być źródłem wysoce toksycznego dla komórek  $OH^{\cdot}$  i dwutlenku azotu ( $NO_2^{\cdot}$ ), będącego również wolnym rodnikiem.

Wolne rodniki powstające w organizmie ludzkim mogą inicjować serie reakcji, które trwają aż do chwili ich usunięcia w kolejnych reakcjach z innymi wolnymi rodnikami, bądź do chwili ich unieczynnienia przez system antyoksydacyjny.

## 1.2. Układ antyoksydacyjny w nasieniu

Dla zapewnienia naturalnej funkcji ustroju, niezbędne jest istnienie równowagi między formowaniem RFT i działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego, czyli wytwarzaniu RFT powinna towarzyszyć ich neutralizacja. Prawidłowe funkcjonowanie obrony antyoksydacyjnej oparte jest na usuwaniu niebezpiecznych dla komórek RFT i tym samym ochronie komórki przed strukturalnym zniszczeniem. Istotą sprawnego systemu obronnego jest:

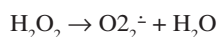
- 1) niedopuszczenie do reakcji RFT ze składnikami komórki (pierwsza linia obrony),
- 2) przerwanie łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych (druga linia obrony) oraz
- 3) usuwanie skutków reakcji RFT z makromolekułami komórkowymi (trzecia linia obrony).

System antyoksydacyjny obejmuje wiele składników, wzajemnie współdziałających ze sobą, a niedobór każdego z nich może powodować obniżenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Ze względu na szczególną wrażliwość męskich komórek rozrodczych na utleniające działanie RFT, nasienie ssaków wyposażone jest w wiele różnorodnych enzymów i związków nieenzymatycznych, neutralizujących nadmiar RFT, umiejscowionych zarówno w plazmie nasiennej, jak i wewnątrz plemników. Podstawowy enzymatyczny system antyoksydacyjny w ejakulacie obejmuje takie enzymy, jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza, peroksydaza glutationowa/reduktaza glutationowa (GPx/GR).

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, EC 1.15.1.1) czyli oksydoreduktaza ponadtlenkowa, jest enzymem katalizującym

reakcję dysmutacji  $O_2^{\cdot -}$  do  $H_2O_2$  i  $O_2$  (1.1.1.). Rodzina białek SOD obejmuje trzy białka, w zależności od metalu obecne- go w centrum aktywnym. W organizmach ssaków występu- ją trzy rodzaje SOD. W cytoplazmie znajduje się SOD zawierająca miedź i cynk (Cu,ZnSOD; SOD-1). Część- czka tego białka jest homodimerem, czyli składa się z dwóch identycznych podjednostek. Każda podjednostka zawiera po 151 reszt aminokwasowych (masa cząsteczkowa 16 kDa). U człowieka, gen kodujący SOD-1 jest umiejscowiony w chromosomie 21. W macierzy mitochondrialnej obec- na jest SOD, zawierająca mangan w centrum aktywnym (MnSOD; SOD-2). Jest ona tetramerem złożonym z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 20 kDa, każda. Enzym ten kodowany jest przez gen, znajdujący się w chromosomie 6. Z kolei na zewnątrz komórek, związana głównie z wielocukrowcami powierzchniowymi znajduje się tzw. pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (extra- cellular superoxide dismutase – EC-SOD). Jej cząsteczki złożone są z czterech podjednostek i zawierają reszty cu- krowcowe. EC-SOD jest białkiem strukturalnie podobnym do SOD-2, ale zawierającym Cu i Zn w centrum katali- tycznym. Wiązanie tego enzymu do powierzchni komórek może być efektywnym sposobem ochrony komórek przed  $O_2^{\cdot -}$ , generowanym w środowisku zewnętrznym, stąd cza- sami nazywa się go „miejscowo specyficznym” enzymem ochronnym. Stwierdzono silną ekspresję Cu,ZnSOD w ca- łym najądrzu [43]. Z kolei EC-SOD występuje w dużych ilościach zarówno w najądrzu, jak i w kanalikach nasien- nych [57]. Działanie SOD ma znaczenie dla ochrony pro- cesu spermatogenezy. Plazma nasienna zawiera dużo ak- tywnej SOD, więcej od innych płynów pozakomórkowych [47,56]. 75% całkowitej aktywności SOD w plazmie nasien- nej przypada na CuZnSOD, a pozostałe 25% na EC-SOD, związanej głównie z obszarem wstawki u plemników o naj- lepszej ruchliwości [59]. Oba te izoenzymy płynu nasien- nego pochodzą z przystaty. Plemniki również są dobrze wyposażone w SOD, w tym w MnSOD oraz duże akty- wności Cu,ZnSOD, nawet większej, w porównaniu z taki- mi tkankami jak nerki czy płuca [67]. Wykazano bezpo- średni związek między aktywnością SOD w plemnikach i ich ruchliwością. Dodatek egzogennej SOD do zawiesi- ny plemników chronił ich żywotność i znacząco obniżał spadek ruchliwości w czasie, przez hamowanie destruk- cji błon biologicznych [47]. Inni badacze nie potwierdza- li wpływu SOD na jakość nasienia i potencjał zapładnia- jący plemników *in vivo* lub *in vitro* [40,84].

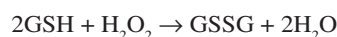
Do najbardziej efektywnych antyoksydantów enzymatycz- nych nasienia oprócz SOD zalicza się enzym zwany katala- zą (EC 1.11.1.6). Katalizuje on reakcję dysproporcjona- cji  $H_2O_2$  do  $O_2^{\cdot -}$  i  $H_2O$ .



Białko katalazy jest tetramerem, złożonym z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 60 kDa każda. Zawiera grupę hemową i miejsce wiązania dla NADPH. Swoistym inhibitorem katalazy jest 3-amino-1,2,4-triazol. Jej swoistość do  $H_2O_2$  wzrasta dopiero przy wyższych stęże- niach substratu,  $>10^{-6}$  M, co występuje albo podczas wybu- chu oddechowego fagocytów, albo przy nadekspresji SOD, uwalniającej duże ilości  $H_2O_2$ . Z tego też powodu sugeruje się jej udział razem z SOD w ochronie plemników przed toksycznym działaniem tlenu w czasie stanu zapalnego,

w męskim układzie rozrodczym [15]. Źródłem katalazy w nasieniu jest prostata, chociaż jej aktywności nie skorelo- wano z markerami tego narządu, takimi jak kwas cytryno- wy czy cynk. Zlokalizowano ją zarówno wewnątrz plemni- ków, jak i w plazmie nasiennej. Przy czym dotąd, obecność katalazy wykazano tylko w ludzkich i szczurzych plemni- kach [44,75]. Jej aktywność znacznie obniża się u nieplod- nych pacjentów z zaburzeniami ruchu [44,69].

Następnym ważnym enzymem, chroniącym komórki przed toksycznym działaniem  $H_2O_2$ , jest peroksydaza glutatio- nowa (GPx, E.C. 1.11.1.9), czyli oksydoreduktaza gluta- tion:  $H_2O_2$ . Białko tego enzymu jest tetramerem, złożonym z czterech identycznych podjednostek o masie cząstecz- kowej 21,5-23 kDa, z których każda zawiera atom selenu. GPx katalizuje reakcję redukcji  $H_2O_2$ , a także nadtlenków organicznych, zwłaszcza nadtlenków lipidowych z udzia- łem zredukowanego glutationu (GSH).



Powstający w wyniku tej reakcji dwusiarczek gluta- tionu (GSSG) jest związkiem niebezpiecznym dla komórki. Inaktywuje białka, tworząc mieszane dwusiarczki z biał- kami zawierającymi grupy tiolowe lub utlenia grupy tio- lowe białek, co prowadzi do powstania mostków disulfid- owych. Fizjologiczną rolą GPx jest usuwanie nadmiaru  $H_2O_2$ . Enzym ten ma większe powinowactwo do  $H_2O_2$ , w stosunku do katalazy, co sugeruje jego istotniejszą rolę w sytuacjach, w których stężenia  $H_2O_2$  są małe. Kierując atak  $H_2O_2$  na GSH, zapobiega jego udziałowi w reakcji Fentona i tworzeniu  $OH^{\cdot}$ . GPx ściśle współdziała z re- duktazą glutationową (GR, EC 1.6.4.2), enzymem odtwa- rzającym zredukowaną postać GSH kosztem utleniania NADPH. Wykazano obecność GPx w plazmie nasiennej i skorelowano z męską nieplodnością [28]. Porównywalne aktywności GPx, u zdrowych mężczyzn i u mężczyzn po wasektomii, sugerują pochodzenie tego enzymu z prosta- ty [79]. W plemnikach GPx jest umiejscowiona w macie- rzy mitochondrialnej. Jej aktywność w dużym stopniu jest związana z poziomami selenu w nasieniu. Pierwiastek ten naturalnie występuje w dużym stężeniu w ejakulacie i od- grywa ważną rolę w podtrzymaniu sprawności seksualnej mężczyzn [35]. Wykazano udział GPx w ochronie plem- ników przed utratą ruchliwości, w wyniku spontanicznej peroksydacji lipidów [10].

Działanie triady enzymatycznej (SOD, katalaza i GPX/ GR), jest wspomagane przez antyoksydanty niskocząstecz- kowe, licznie reprezentowane w nasieniu. Należą do nich tiol- e, kwas askorbinowy [25], kwas moczowy [73], tau- ryna, hipotauryna [11],  $\alpha$ -tokoferol [72] i inne. Na uwagę zasługują związki tiolowe, a wśród nich wspomniany już wcześniej GSH oraz aminokwasy, homocysteina i cyste- ina. GSH pełni funkcję ochronną na wszystkich trzech lini- ach obrony antyoksydacyjnej. Do najważniejszych zadań GSH w komórkach należy: utrzymywanie grup tiolowych białek w postaci zredukowanej, reakcje z nadtlenkami or- ganicznymi, z  $H_2O_2$ , z wolnymi rodnikami oraz z dwu- siarczkami białek. Poziom GSH w plemnikach jest uzu- pełniany przez komórki Sertolego w celach ochronnych przed RFT oraz jako źródło aminokwasów dla spermat-



genezy [53]. Obserwowano spadek zredukowanego GSH wewnątrz plemników u mężczyzn nieplodnych [16,58]. Z kolei cysteina jest prekursorem aktywnych biologicznie związków, takich jak hipotauryna i tauryna, neutralizujących działanie HOCl.

Właściwości antyoksydacyjne plazmy nasiennej u ludzi, wspomagane są dodatkowo przez prostatosomy. Te swoiste dla człowieka, organella komórkowe, bogate w cholesterol i sfingomielinę, oprócz wielu ważnych funkcji w procesie zapłodnienia, mają też właściwości antyoksydacyjne. Nie wykazano w nich wprawdzie aktywności SOD, a ich antyoksydacyjną funkcję wiąże się z ich interakcją z leukocytami obecnymi w nasieniu, co sugeruje ochronną rolę wobec plemników w stanach leukocytospermii. Najprawdopodobniej, prostatosomy redukują zdolność leukocytów do wytwarzania  $O_2^{\cdot-}$ , przez hamowanie aktywności błonowej oksydazy NADPH, chociaż mechanizm tej interakcji nie został jeszcze dobrze poznany [63,64].

### 1.3. RFT a fizjologia plemników

RFT w małych stężeniach, są nieodłącznym elementem procesów fizjologicznych plemnika, prowadzących do zapłodnienia komórki jajowej. Ich pozytywna rola zaznacza się już na etapie różnicowania komórek gametogenicznych w gonadzie męskiej. Tutaj RFT uczestniczą w procesie kondensacji DNA. W gonadzie męskiej biorą też udział w lokalnym systemie regulacyjnym, kontrolującym wydajność spermatogenezy, przez indukcję dwóch przeciwstawnych procesów, apoptozy i proliferacji [2].

Zapłodnienie jest skomplikowanym i wieloetapowym procesem, obejmującym następujące fazy: kapacytację plemników, wzajemne „rozpoznawanie” gamet, penetrację osłonki przejrzystej, reakcję akrosomalną, połączenie plemnika z błoną komórkową oocytu i uruchomienie mechanizmów zapobiegania polispermii. Plemniki muszą przejść wiele zmian molekularnych i metabolicznych, aby były zdolne do fuzji z komórką jajową. Zmiany te obejmują m.in. modyfikacje struktury i zmiany w topografii lipidów i białek błon komórkowych czy zmiany powinowactwa w wiązaniu ligandów cukrowych. Wszystkie te odwracalne zmiany, jakim podlega błona komórkowa główki i witki plemnika przed zapłodnieniem, określa się mianem kapacytacji i zachodzą one w żeńskich drogach rozrodczych. Elementem niezbędnym do przygotowania plemnika do penetracji komórki jajowej jest tzw. hiperaktywacja gamet męskich, przejawiająca się w zmianie charakteru ich ruchu oraz w zwiększeniu prędkości i siły ruchów witki. Bez osiągnięcia stanu hiperaktywacji plemniki pozostają niezdolne do wiązania z osłonką przejrzystą (zona pellucida – ZP) oocytu, a co za tym idzie są niezdolne do zapłodnienia komórki jajowej. Kontakt skapacytowanego plemnika ze wzgórkami jajonośnym lub osłonką przejrzystą jest sygnałem do zajścia reakcji akrosomalnej, podczas której dochodzi do: 1) fuzji plazmolemy plemnika z zewnętrzną błoną akrosomalną, 2) uwolnienia enzymatycznej zawartości akrosomu (organellum komórkowe zbliżone do lizosomu, w prawidłowym plemniku umiejscowione w przedniej części plemnika, na szczycie jego główki, bezpośrednio pod plazmolemą) i 3) ekspozycji wewnętrznej błony z przyłączonymi do niej enzymami. Uwolnione enzymy akrosomalne indukują penetrację plemnika i po-

wodują jego zagłębienie w osłonce przejrzystej. Po przejściu przez osłonkę przejrzystą następuje fuzja plemnika z komórką jajową.

Proces nabywania przez gamety męskie zdolności do zapłodnienia jest nieodłączną częścią metabolizmu tlenowego plemników i wiąże się z procesami oksydacyjnymi, a wzrost w tym czasie wytwarzania  $O_2^{\cdot-}$  i w konsekwencji  $H_2O_2$  w plemnikach jest jednym z podstawowych elementów tego procesu.  $O_2^{\cdot-}$  nazywany jest fizjologicznym mediatorem hiperaktywacji i kapacytacji ludzkich plemników. Wskazują na to doświadczenia, w których plemniki poddawano działaniu układu: ksantyna + oksydaza ksantynowa (układ generujący  $O_2^{\cdot-}$ ) w obecności katalazy usuwającej  $H_2O_2$ , uzyskując silną hiperaktywację. Z kolei SOD blokowała hiperaktywację i kapacytację plemników, zarówno spontaniczną, jak i indukowaną przez  $O_2^{\cdot-}$  [22,23,82]. Kapacytację indukowano również *in vitro* małymi stężeniami  $H_2O_2$  w plemnikach chemicznych [17] i ludzkich [32].

Mechanizm, w oparciu o który RFT stymulują te procesy jest ściśle związany ze wzrostem stężenia  $Ca^{2+}$  i cAMP we wnętrzu komórki. Z kolei cAMP, jako drugi przekaznik, razem z kinazą białkową A (PKA) jest niezbędny do fosforylacji reszt tyrozynowych białek błonowych. Oprócz indukcji procesu fosforylacji tyrozynowej, wzrost poziomu cAMP w plemniku nastawia przemiany węglowodanowe na zwiększone wytwarzanie ATP w komórce, w celu zwiększenia ruchliwości plemników, niezbędnej w czasie pokonywania osłonki przejrzystej oocytu. Stymulacja fosforylacji tyrozynowej jest więc najważniejszym wydarzeniem w procesie kapacytacji plemników i jest regulowana przez system redoks komórki plemnikowej [9,50]. Związki między wytwarzaniem RFT, a poziomem cAMP i fosforylacją reszt tyrozynowych białek nie są jeszcze do końca poznane. Sugeruje się, że RFT indukują proces kapacytacji i reakcji akrosomalnej pośrednio, regulując stężenie  $Ca^{2+}$ , poprzez wzrost pH w komórce, prawdopodobnie uczestnicząc w aktywacji wymiennika  $Na^+/H^+$  w błonie plazmatycznej. Przypuszczalnie  $O_2^{\cdot-}$  bierze też udział w inaktywacji pompy  $ATP-Ca^{2+}$ , zwiększając tym samym bierną przepuszczalność błony komórkowej dla  $Ca^{2+}$ . Z kolei stymulacja fosforylacji tyrozyny w czasie kapacytacji plemników przez  $H_2O_2$ , może się odbywać albo przez bezpośrednią aktywację kinaz tyrozynowych, albo przez hamowanie fosfataz tyrozynowych [24,36]. Poza tym  $H_2O_2$  aktywuje bezpośrednio cyklazę adenylanową do wytwarzania cAMP, prowadząc do wzrostu stężenia  $Ca^{2+}$  wewnątrz plemników [62].

RFT mogą także ułatwiać reakcję akrosomalną przez wzrost aktywności fosfolipazy  $A_2$  ( $PLA_2$ ). Enzym ten jest obecny w ludzkich plemnikach i katalizuje reakcje hydrolizy fosfolipidów do kwasu arachidonowego. Powstały w tej reakcji arachidonian jest głównym produktem fuzji błony plazmatycznej plemnika i zewnętrznej błony akrosomalnej w czasie reakcji akrosomalnej. Warto podkreślić, że aktywność  $PLA_2$  jest stymulowana stężeniem  $Ca^{2+}$  w komórce i poziomem produktów peroksydacji wewnątrz błonowych. RFT, poprzez inicjację niskich poziomów peroksydacji lipidów stwarzają dogodne warunki dla  $PLA_2$ , umożliwiając tym samym przygotowanie plemnika do zapłodnienia [29].

Udokumentowano również udział  $NO^{\cdot}$  w kapacytacji i reakcji akrosomalnej plemników. Działanie małych stężeń

NO<sup>•</sup> indukuje reakcję kapacytacji w ludzkich plemnikach, w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [83]. Z kolei poprzez działanie na cyklazę adenylanową, NO<sup>•</sup> zwiększa poziom cAMP w komórce. Badania sugerują również udział NO<sup>•</sup> w reakcji kapacytacji, przez bezpośrednie oddziaływanie na procesy fosforylacji reszt tyrozynowych dwóch białek plemnikowych, p81 i p105. NO<sup>•</sup> może też bezpośrednio partycypować w zdolności plemników do zapłodnienia, przez udział w penetracji osłonki przejrzystej i fuzji plemnika z komórką jajową [37,38].

Niekwestionowana rola RFT w procesie zapłodnienia wiąże się ściśle z ich funkcją przekaźnikową. RFT uczestniczą w głównych szlakach przekazywania informacji do komórki czy interakcji międzykomórkowych i dzięki temu mogą modyfikować procesy metaboliczne na różnych etapach, a charakter i wielkość tych modyfikacji zależy od natury, ilości i dostępności reaktywnych metabolitów.

#### 1.4. Drogi wyrzutu RFT

Przy zastosowaniu inhibitorów wyrzutu RFT w połączeniu z frakcjonowaniem plemników, wykazano, że w plemnikach zwierzęcych istnieją co najmniej dwa mechanizmy wytwarzania RFT: mitochondria i wyciek elektronów w łańcuchu oddechowym oraz kompleks enzymatyczny zawarty w błonie komórkowej, czyli błonowa oksydaza NADPH.

Enzym, oksydaza NADPH (EC 1.6.2.4), jest układem białek przenoszących elektrony z wewnątrzkomórkowej puli NADPH na cząsteczki tlenu na zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej. Enzym ten nie jest swoisty dla komórek fagocytujących. Jego obecność stwierdzono również w błonie plazmatycznej komórek niefagocytarnych, m.in. komórek śródbłonna, fibroblastów, komórek mezanialnych, mięśni gładkich naczyń krwionośnych, tarczycy, a także męskich komórek rozrodczych. Istnieją znaczne różnice w strukturze i aktywności między plemnikową oksydazą NADPH i dobrze scharakteryzowanym enzymem fagocytów. U tych ostatnich, w skład białkowego kompleksu wchodzi: związane z błoną, flawoproteina o masie cząsteczkowej około 150 kDa i cytochrom b558, którego cząsteczki są zbudowane z dwóch podjednostek p22phox i gp91 oraz dwa składniki cytoplazmatyczne, p47phox i p67phox, które przemieszczają się do błony podczas aktywacji granulocytów. Nie stwierdzono natomiast obecności podjednostek p22phox, p47phox i p67phox w plemnikach szczurzych [76].

$NADPH + O_2 \rightarrow NAD^+ + H^+ + 2O_2^{\cdot -}$  „wybuch oddechowy”

Aktywność plemnikowej oksydazy NADPH jest znacząco mniejsza, w porównaniu z enzymem fagocytów [13]. Fizjologicznymi stymulatorami wybuchu tlenowego fagocytów są głównie bakterie i inne czynniki infekcyjne. Może być on pobudzany również przez wiele innych czynników, do których należą m.in.: czynniki chemotaktyczne fagocytów (np. n-formylo-metyonylo-leucylo-fenylalanina – FMLP), estry forbolu (np. 12-mirystynian, 13-octan forbolu – PMA), jonofory Ca<sup>2+</sup> czy cząstki opsonizowane obcego pochodzenia (np. opsonizowany zymosan). W przeciwieństwie do leukocytów, induktory te nie stymulują oksydazy NADPH do zwiększonego wytwarzania O<sub>2</sub><sup>•-</sup> w plemnikach, z wyjątkiem uszkodzonych ludzkich plemników,

które odpowiadają aktywacją błonowej oksydazy NADPH i w konsekwencji zwiększonym wytwarzaniem O<sub>2</sub><sup>•-</sup> w odpowiedzi na PMA [30]. Wykazano też, że aktywność błonowej oksydazy NADPH jest stymulowana przez NADPH, ale hamowana przez inhibitory flawoprotein, w szczególności przez jodonian dwufenyloowy (iodonium diphenylene – DPI). Ta właściwość dotyczy zarówno plemników, jak i leukocytów [5]. Znajomość struktury oksydazy NADPH może pomóc w wyjaśnieniu komórkowych mechanizmów regulujących funkcję plemników i rozwoju strategii antykoncepcji, skierowanej przeciw gamecie męskiej.

Drugim istotnym źródłem O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i w konsekwencji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> są mitochondria i zachodzący w nich proces fosforylacji oksydacyjnej. Polega on na przenoszeniu atomów wodoru na tlen przez układy oksydo-redukcyjne dehydrogenaz, a energia uwolniana podczas tego procesu wykorzystywana jest do syntezy ATP. Przepływ elektronów przez łańcuch oddechowy nie jest szczelny i pewna ich część „przecieka” na zewnątrz. W wyniku jednoelektronowej redukcji powstają duże ilości O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Za wyciek elektronów w łańcuchu oddechowym są odpowiedzialne flawoproteina – dehydrogenaza NADH i ubichinon. Ilość powstającego O<sub>2</sub><sup>•-</sup> w łańcuchu oddechowym, zależy przede wszystkim od dostępności samego tlenu i substratów dla odpowiednich dehydrogenaz, takich jak pirogronian, jabłczan, mleczan czy bursztynian. Dodatek niektórych z nich do zawiesiny szczurzych plemników najdłuższych, dramatycznie zwiększa wytwarzanie RFT [76].

Udokumentowano także udział diaforazy (EC 1.6.99.2), czyli oksydoreduktazy NADH, w wytwarzaniu O<sub>2</sub><sup>•-</sup> przez plemniki. Największa aktywność tego enzymu występuje w mitochondrium i jest on zintegrowany z łańcuchem oddechowym. Enzym ten jest umiejscowiony w regionie wstawki plemnika i znajduje się w ścisłym połączeniu z łańcuchem mitochondrialnym. Ta reduktaza chinonowa katalizuje przeniesienie jednego elektronu na chinony, tworząc rodnik semichinonowy, który w obecności tlenu cząsteczkowego może ulegać autoutlenianiu tworząc O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [27].

Źródłem dużych ilości O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i w konsekwencji, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w nasieniu jest także enzym oksydaza ksantynowa (EC 1.2.3.2), czyli oksydoreduktaza ksantyna: tlen, obecna w plemnikach i plazmie nasiennej. Enzym ten katalizuje reakcje utleniania hipoksantyny do ksantyny i ksantyny do kwasu moczowego. Utlenia również aldehydy do odpowiednich kwasów karboksylowych. W trakcie reakcji, cząsteczki tlenu podlegają redukcji, zarówno jedno-, jak i dwuelektronowej. W pierwszym przypadku produktem redukcji jest O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, w drugim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zaobserwowano wzrost aktywności oksydazy ksantynowej w plemnikach u nieplodnych mężczyzn [48].

#### 1.5. Plemniki i leukocyty jako komórkowe źródła RFT w nasieniu

Plemniki konstytutywnie generują RFT, które w warunkach fizjologicznych powstają w łańcuchu oddechowym i są niezbędne do zachowania prawidłowej czynności gamet typu przekazywanie sygnałów wewnątrz- lub międzykomórkowych, czy zapłodnienie komórki jajowej. RFT są obecne w komórkach, w małych stężeniach, które jednak mogą ulec zwiększeniu, wskutek bodźców zewnętrznych. Są

dwa potencjalne źródła RFT w nasieniu: leukocyty i plemniki. Niektóre wcześniejsze badania udowodniały dominację plemników w wytwarzaniu RFT w grupie pacjentów z oligozoospermią, w stosunku do zdrowych osobników z normozoospermią [3]. Brak dużej przestrzeni cytoplazmatycznej wewnątrz plemników zapewnia wystarczający dostęp do NADPH, jako substratu, do utrzymywania stałych, niewielkich ilości  $O_2^{\cdot -}$ , niezbędnych w procesie kapacytacji. Jeśli ilość cytoplazmy zwiększa się, np. w uszkodzonych plemnikach, mających resztki cytoplazmy wokół wstawki, zwiększa się dostępność NADPH i powstaje  $O_2^{\cdot -}$  w ilościach, przy których może dojść do indukcji uszkodzeń peroksydacyjnych [8].

Większość badaczy sugeruje jednak udział leukocytów, jako głównej frakcji komórkowej nasienia, w wytwarzaniu RFT. Powszechna obecność leukocytów w nasieniu, z dominującą subpopulacją granulocytów obojętnochłonnych, jest nieodłącznie związana z wytwarzaniem RFT. Wykazano także pozytywną korelację pomiędzy stężeniem leukocytów i stopniem generacji RFT w nasieniu. Ponadto, aktywowane granulocyty mają zdolność do wytwarzania RFT setki razy większą niż plemniki i mogą być źródłem uszkodzeń gamet męskich, wywołanych stresem oksydacyjnym [4]. Kliniczne znaczenie obecności dużej liczby leukocytów w nasieniu jest przedmiotem kontrowersji. Wzrost liczby leukocytów w nasieniu może być wynikiem: nieprawidłowej spermatogenezy, działania szkodliwych czynników środowiskowych (alkohol, papierosy), nietypowych stosunków płciowych czy długiej abstynencji seksualnej. Jednak najczęstszą przyczyną podwyższonej liczby komórek fagocytarnych w ejakulatach są infekcje i stan zapalny w narządach płciowych.

Badanie poziomów RFT w nasieniu jest ważnym czynnikiem determinującym potencjał metaboliczny plemników. Plemniki mają swój własny, wewnątrzkomórkowy system antyoksydacyjny, dodatkowo wspomagany ochronną rolą plazmy nasiennej, dla obrony przed szkodliwym wpływem stresu oksydacyjnego, wywołanego przez zaktywowane leukocyty. Jednak nadal nie wiadomo, które subpopulacje plemników w ejakulacie dysponują najlepszą linią obrony, skutecznej w neutralizacji toksycznych pochodnych tlenu i kiedy następuje przełamanie tej bariery, a włączają się procesy peroksydacyjne, zaburzające strukturę i funkcję gamety męskiej.

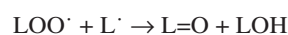
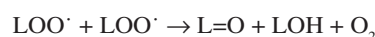
## 2. PEROKSYDACYJNE USZKODZENIA PLEMNIKÓW

Zaburzenie równowagi między wytwarzaniem RFT i wydajnością układu antyoksydacyjnego prowadzi do stresu oksydacyjnego, zwanego też szokiem tlenowym. Krótkotrwały wzrost wytwarzania wolnych rodników zazwyczaj jest dobrze tolerowany przez komórki, które w takich sytuacjach najczęściej reagują wzmożoną aktywnością mechanizmów obronnych. Jednak nasilony lub długo utrzymujący się stan stresu oksydacyjnego jest szkodliwy dla komórek i jest przyczyną zaburzeń w metabolizmie komórkowym, będących skutkiem oddziaływań RFT ze składnikami komórkowymi. Już pół wieku temu sygnalizowano, że RFT w pewnych warunkach mogą być niebezpieczne dla gamet męskich [55,74]. Wielu badaczy zgodnie potwierdza istnienie związku pomiędzy peroksydacyjnym uszkodzeniem plemników a niepłodnością męską [68]. Do stresu oksydacyjnego

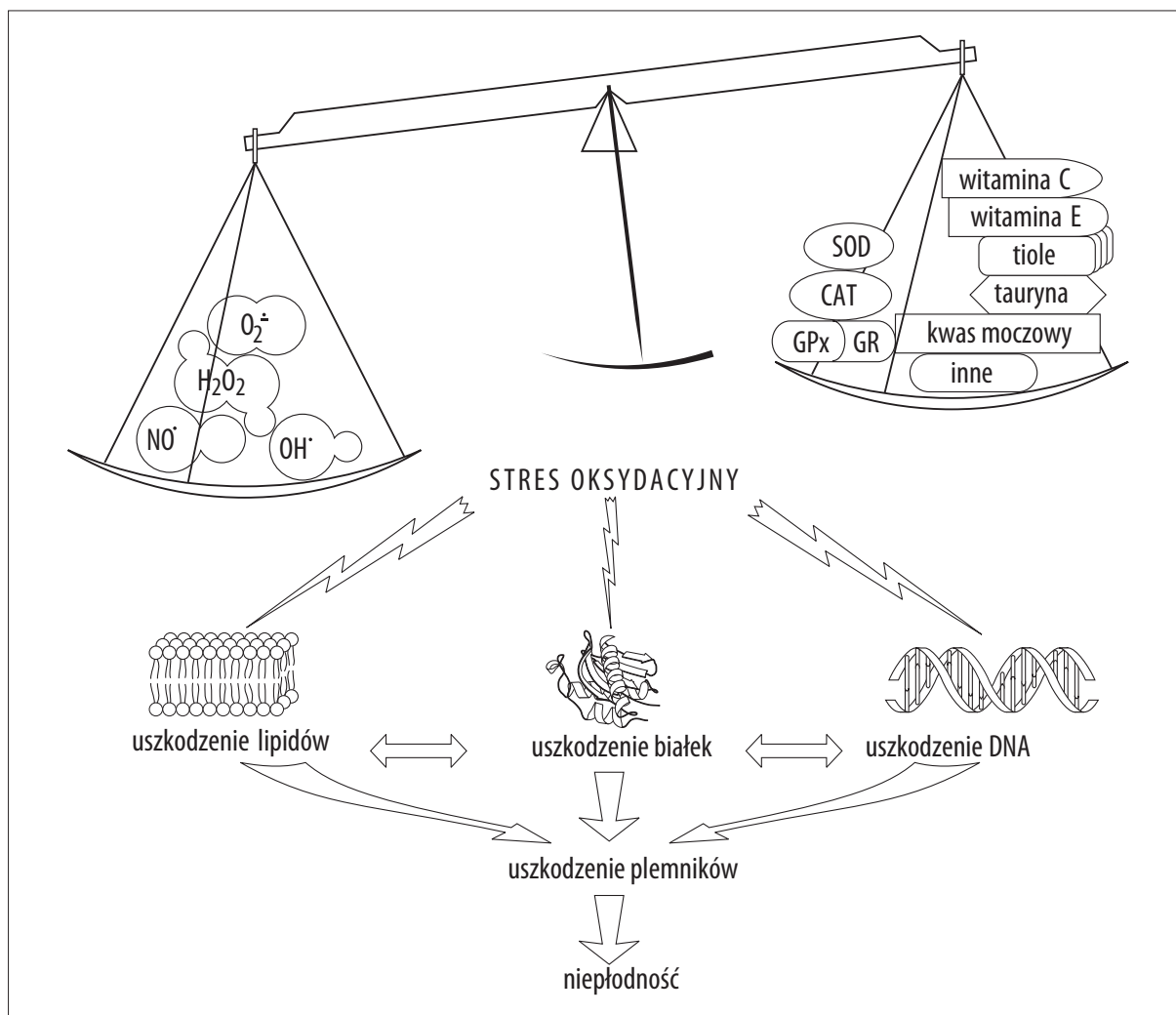
w nasieniu dochodzi zarówno *in vivo* (wzrost wytwarzania RFT przez niedojrzałe i uszkodzone plemniki w wyniku zaburzonej spermatogenezy lub infiltracja leukocytów), jak i *in vitro* (obróbka laboratoryjna: wirowanie, procesy zamrażania i rozmrażania). Niekontrolowany wzrost  $O_2^{\cdot -}$  i  $H_2O_2$  stwarza niebezpieczeństwo wywołania trwałych zmian w budowie makromolekuł komórkowych i ważnych biologicznie makrocząsteczek (ryc. 1).

### 2.1. Stres oksydacyjny i peroksydacja lipidów błon komórkowych

Peroksydacja lipidów jest jednym z ważniejszych procesów biologicznych związanych z działaniem RFT. Będąc procesem kaskadowym, zapewnia ciągłą dostawę wolnych rodników, które inicjują następne reakcje peroksydacji. Jak każdy proces wolnorodnikowy, składa się on z trzech faz: inicjacji, prolongacji i terminacji. Wolne rodniki np.  $OH^{\cdot}$ , zapoczątkowują reakcję przez odłączenie atomu wodoru z łańcucha bocznego (LH) WKT do wody i rodnika alkiłowego ( $L^{\cdot}$ ) (1). Wolny rodnik kwasu tłuszczowego ulega następnie przebudowie do postaci dienowej. W reakcji prolongacji,  $L^{\cdot}$  reaguje z tlenem cząsteczkowym, tworząc wolny rodnik nadtlenkowy ( $LOO^{\cdot}$ ) (2). Rodnik ten odłączając atom wodoru z LH kolejnego kwasu tłuszczowego, przyczynia się do formowania następnej cząsteczki  $L^{\cdot}$  i kontynuacji wywołanej reakcji łańcuchowej, w wyniku której powstaje produkt końcowy utleniania lipidów, tj. nadtlenek kwasu tłuszczowego ( $LOOH$ ) (3). Powyższy cykl reakcji kończy faza terminacji, w czasie której nadtlenki lipidowe podlegają dalszej peroksydatywnej degradacji do produktów końcowych. Są wśród nich m.in.: aldehydy, a wśród nich najpopularniejszy, dialdehyd malonowy (MDA), hydroksykwasy, w tym 4-hydroksyalkenale, 2-alkenale oraz ketony czy węglowodory, takie jak etan i pentan (4). Głównym produktem peroksydacji komponentu lipidowego błon komórkowych i jednocześnie bardzo dobrym markerem do badania tego procesu jest MDA. Wykorzystuje się tu reakcję barwną pomiędzy produktami peroksydacji lipidów i kwasem tiobarbiturowym (TBA). Akumulacja tych zmodyfikowanych, uszkodzonych cząsteczek lipidów nieuchronnie prowadzi do obniżenia płynności błon, a zmieniona struktura błon komórkowych ma bezpośredni wpływ na ich funkcje receptorowe i transportowe [34].



Plemniki, ze względu na dużą zawartość WKT w błonach komórkowych, są szczególnie podatne na peroksydację błon, co może prowadzić do patologii nasienia męskiego i tym samym stanowić jedną z przyczyn niepłodności męskiej. Jednak odpowiednia ilość WKT w błonach jest niezbędna w procesie zapłodnienia. Podczas spermatogenezy i dojrzewania gamet zachodzą aktywne procesy me-



Ryc. 1. Stres oksydacyjny i jego skutki w nasieniu

taboliczne lipidów, regulujące właściwe proporcje między poszczególnymi składnikami lipidowymi błon komórkowych, które są niezbędne do utrzymania fizjologicznych funkcji plemnika. W prawidłowych, dojrzałych plemnikach, 50% wszystkich kwasów tłuszczowych stanowią nasycone kwasy tłuszczowe, reprezentowane głównie przez kwasy, palmitynowy i stearynowy. 15% przypada na kwasy mononienasycone, z wyraźną dominacją kwasu olejowego. Natomiast WKT stanowią 30% wszystkich kwasów tłuszczowych, z tego ponad 2/3 (>60%) przypada na kwas dokozaheksanowy (DHA), a 1/3 na kwas arachidonowy [80]. Procentowy rozkład poszczególnych kwasów tłuszczowych wyraźnie koreluje z morfologią gamet męskich i w nieprawidłowych postaciach prawie o 20% maleje zawartość WKT. Tak dzieje się np. w leukocytospermii, gdzie plemniki są ekspozowane na RFT generowane przez leukocyty [81].

Proces peroksydacji błonowych fosfolipidów w męskich komórkach rozrodczych jest inicjowany przez promocyjne działanie jonów metali przejściowych,  $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  (reakcja Fentona) i powszechnie uważany za podstawowy mechanizm indukowanego przez RFT uszkodzenia tych komórek. Wzrost nieswoistej przepuszczalności błon plemników

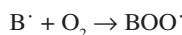
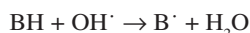
w wyniku modyfikacji strukturalnych komponentu lipidowego błon, jest odpowiedzialny za obniżenie ruchliwości i przeżywalność gamet męskich, głównie na skutek utraty ATP [12,47], zmian w morfologii [60] i w konsekwencji ma znaczenie dla funkcjonowania plemników w procesie zapłodnienia [6,7].

## 2.2. Stres oksydacyjny i uszkodzenia białek

Modyfikacje oksydacyjne białek są jednymi z wcześniejszych zmian, do których dochodzi podczas stresu oksydacyjnego. Reakcje RFT z białkami prowadzą do zmian w ich strukturze, a tym samym do utraty aktywności biologicznej. W czasie utleniania białek może dojść do modyfikacji reszt aminokwasowych, modyfikacji grup prostetycznych oraz agregacji lub fragmentacji cząsteczek białkowych. Spośród grup aminokwasowych białek najbardziej podatne na oksydacyjne uszkodzenia są reszty cysteiny i metioniny, ze względu na obecność grup  $-SH$ , a w dalszej kolejności, reszty lizyny, proliny, histydyny, tryptofanu, fenyloalaniny, tyrozyny i argininy. Uszkodzenia aminokwasów aromatycznych, zwłaszcza tyrozyny, prowadzi do powstania grup redukujących w białkach, zdolnych do redukcji cytochromu c i metali.



Głównym mediatorem uszkodzenia białek przez RFT jest  $\text{OH}^\cdot$ , chociaż niektóre modyfikacje tych makromolekuł komórkowych, takie jak utlenianie grup  $-\text{SH}$  do mostków dwusiarczkowych ( $-\text{S}-\text{S}-$ ), mogą być wywoływane bezpośrednio przez  $\text{O}_2^\cdot-$  czy  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Również  $\text{HOCl}$  i  $\text{NOO}^\cdot$  mogą utleniać grupy tiolowe białek i reszty metionylowe.



W reakcjach  $\text{OH}^\cdot$  z białkami dochodzi do oderwania atomu wodoru od cząsteczki białka i powstania rodnika białkowego z niesparowanym elektronem ( $\text{B}^\cdot$ ). Ten niesparowany elektron może się przemieszczać w cząsteczce białka, co prowadzi do dalszych jej modyfikacji, do rozpadu wiązań peptydowych włącznie. Rodniki białkowe mogą z kolei przyłączać cząsteczki tlenu, w wyniku czego powstaje rodnik nadtlenku białka ( $\text{BOO}^\cdot$ ). Nadtlenki białek są stosunkowo nietrwałe i zamiast wchodzić w reakcje z inną cząsteczką białkową, najczęściej reagują z niskocząsteczkowym antyoksydantem, takim jak GSH czy askorbinian. W związku z tym, w przeciwieństwie do peroksydacji lipidów, powstawanie nadtlenków białek nie ma charakteru reakcji łańcuchowej, co w dużym stopniu obniża wydajność peroksydacji białek. W miarę starzenia się komórek, dochodzi do kumulacji utlenionych białek, a to może prowadzić do stopniowej utraty niektórych biochemicznych i fizjologicznych funkcji komórek i obniżenia ich podatności na mechanizmy reparacyjne [20].

Wzrost ilości utlenionych białek w gametach męskich ma duże znaczenie dla prawidłowego przebiegu kolejnych etapów procesu zapłodnienia. Może być przyczyną spadku ATP w plemnikach, co ma ogromne znaczenie dla reakcji hiperaktywacji. Oksydacyjne modyfikacje w strukturze i topografii białek błonowych główki i witki plemnika mogą zaburzać kapacytację, reakcję akrosomalną i w efekcie fuzję oocyt-plemnik, podobnie jak uszkodzenie białek enzymatycznych, np. cyklazy adenylanowej w wyniku utleniania grup  $-\text{SH}$  do  $-\text{S}-\text{S}-$ , co zmniejsza wytwarzanie cAMP, głównego mediatora biorącego udział w procesie zapłodnienia [1,19].

### 2.3. Stres oksydacyjny i uszkodzenia DNA

Za uszkodzenia DNA jest odpowiedzialny przede wszystkim  $\text{OH}^\cdot$ , natomiast  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^\cdot-$  nie powodują zmian w składnikach kwasów nukleinowych. Istnieją dwie koncepcje, tłumaczące uszkodzenie DNA w następstwie stresu oksydacyjnego: 1) uszkodzenie DNA przez  $\text{OH}^\cdot$ , wytwarzane w reakcji  $\text{H}_2\text{O}_2$  z jonami metali związanymi z DNA (reakcja Fentona); być może stres oksydacyjny dodatkowo wspomaga tę reakcję, uwalniając jony metali przejściowych, wskutek czego mogą się one wiązać z DNA, 2) działanie pośrednie, poprzez aktywację endonukleaz, wskutek uruchomienia mechanizmów, prowadzących do zwiększenia stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce. W wyniku oddziaływania  $\text{OH}^\cdot$  z kwasami nukleinowymi najczęściej dochodzi do uszkodzenia zasad nukleinowych, reszt cukrowcowych, rozerwania wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy lub tworzenia wiązań poprzecznych DNA-białko. Zmodyfikowane produkty zasad azotowych, takie jak: 8-hydroksyguanina, 8-hydroksyadenina, glikol cytozyny czy glikol tyminy mogą podlegać

kolejnym chemicznym przekształceniom, prowadzącym do ich dalszej degradacji. Produkty tych reakcji często mają charakter mutagenny. Wiele z nich służy też jako markery do badania uszkodzeń DNA w komórkach [33].

Potwierdzono wrażliwość plemnikowego DNA na uszkodzenia oksydacyjne, a tworzenie przez RFT pojedynczych lub podwójnych pęknięć nici DNA w gametach męskich ma istotne konsekwencje dla ich zdolności rozrodczej [41]. Są one przyczyną zaburzeń dekondensacji plemnikowego DNA przez komórkę jajową, uniemożliwiając tym samym wytworzenie przedjądźry [65]. Mogą też być powodem nieprawidłowego ukształtowania i rozwoju zarodka, co ma szczególne znaczenie, zwłaszcza przy stosowaniu technik wspomaganego rozrodu. Suplementacja *in vitro*, nieenzymatycznych antyoksydantów, takich jak: kwas askorbinowy, kwas moczowy czy  $\alpha$ -tokoferol, w dużym stopniu niweluje anomalie w budowie chromatyny plemników i zmniejsza liczbę pęknięć nici DNA [42].

Zwraca się też uwagę na znaczenie oksydacyjnych uszkodzeń w mitochondrialnym DNA (mtDNA) w procesie zapłodnienia, zwłaszcza, że plemniki są bogato wyposażone w te organella komórkowe, jako źródło energii niezbędnej do ruchu witki [45]. Co więcej, mtDNA jest bardziej narażony na uszkodzenia oksydacyjne, w porównaniu z jądrowym DNA, ze względu na bliskie sąsiedztwo łańcucha fosforylacji oksydacyjnej, ograniczone możliwości naprawcze i brak białek jądrowych, które mogłyby chronić go przed uszkodzeniami.

Niewykluczone, że mechanizm uszkodzenia DNA przez RFT odbywa się za pośrednictwem procesu apoptozy. Ostatnio zainteresowanie badaczy skupia się na mechanizmach warunkujących proces samobójczej śmierci komórki i jego wpływie na potencjał rozrodczy gamet męskich.

### 2.4. Stres oksydacyjny i apoptoza plemników

Apoptoza jest naturalnym procesem fizjologicznym, występującym w tkankach zwierząt na różnym etapie ich rozwoju. Obejmuje kaskadę morfologicznych i biochemicznych zdarzeń, prowadzących do samobójczej śmierci komórki pod wpływem różnych czynników endo- i egzogennych, do których należą m.in. hormony, cytokiny, RFT, czynniki infekcyjne i inne. Apoptozie towarzyszą takie zmiany, jak: obkurczenie komórki na skutek utraty wody, zagęszczenie chromatyny jądrowej, fragmentacja i degradacja DNA, reorganizacja cytoszkieletu i zmiany w błonie komórkowej, prowadzące do utworzenia tzw. ciałek apoptotycznych, które szybko ulegają fagocytozie przez otaczające komórki. Dzięki temu nie dochodzi do procesu zapalnego. Sygnał inicjujący proces samobójczej śmierci komórki może pochodzić z wnętrza komórki, a dokładniej z mitochondriów (np. rodzina białek Bcl-2) albo z otoczenia komórki przez pobudzenie receptorów śmierci komórki (np. system białek Fas/FasL). Po otrzymaniu przez komórkę sygnału apoptotycznego, zostają zaktywowane enzymy, należące do grupy proteaz cysteinowych zwanych kaspazami, które odpowiadają za zmiany apoptotyczne w komórce [21,46].

Badania modelowe na zwierzętach potwierdzają istotne znaczenie apoptozy dla prawidłowego przebiegu procesu spermatogenezy, regulujące liczbę komórek gametogenicznych

w nabłonku plemnikotwórczym, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Spontaniczną apoptozę spermatogonii, spermatocytów i spermatyd stwierdzano też w ludzkich gonadach u zdrowych mężczyzn i u pacjentów z azoospermia, bez bloku w przewodach wyprowadzających [70]. Apoptoza jest jednym z mechanizmów eliminowania komórek nieprawidłowych, jednak kontroluje proliferację. Uważa się, że za regulację apoptozy w gonadzie męskiej jest odpowiedzialne głównie białko receptorowe Fas, którego ekspresję wykazano na powierzchni komórek gametogenicznych, jak i dojrzałych plemników oraz współdziałające z nim białko FasL, pełniące rolę liganda receptora Fas, obecne na komórkach Sertolego i na powierzchni plemników gryzoni [51]. Niektóre badania potwierdzają udział systemu Fas/FasL w regulacji apoptozy w gonadzie męskiej tylko w niektórych stanach patologicznych, w szczególności w czasie stresu [18]. Stwierdzano na przykład wzrost >50% plemników, mających białko Fas na swojej powierzchni w próbkach nasienia, pochodzących od mężczyzn z patologicznym spermioqramem [66].

RFT są znanymi induktorami apoptozy zarówno w komórkach somatycznych, jak i germinalnych [31,61]. Najważniejszym etapem procesu apoptozy jest fragmentacja DNA na nukleosomy, czyli fragmenty DNA o długości 180–200 par zasad, które w komórkach somatycznych można uwidocznić w żelu agarozowym w postaci „drabinki”, po wybarwieniu bromkiem etydyny [78]. Fragmentacja DNA jest katalizowana przez endonukleazy, zależne od  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ . Zatem zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie aktywuje enzymy nukleolityczne. Jedną z hipotez indukcji apoptozy przez RFT zakłada, że wzrost ilości wolnych rodników powoduje uwolnienie  $Ca^{2+}$  z mitochondriów, co inicjuje proces apoptozy. RFT mogą też regulować apoptozę przez wpływ na ekspresję dwóch głównych grup czynników zaangażowanych w apoptozę, Bcl-2 i FasL [39].

Podwyższony indeks apoptotyczny w ejakulacie, stwierdzano w stanach zapalnych, nowotworach układu rozrodczego czy

wreszcie u nieplodnych mężczyzn [14,26,77]. Prawdopodobnie ma to ścisły związek ze stresem oksydacyjnym. Obserwowano np. wzrost fragmentacji DNA plemników po inkubacji z układem generującym RFT. Proces ten był znacząco redukowany w obecności antyoksydantów [54]. Obecność pofragmentowanego DNA w ejakulowanych plemnikach korelowano także ze zmianami w spermatogenezie oraz z morfologią plemników [66]. Niewiadomo, czy zmiany apoptotyczne w ejakulowanych plemnikach są wynikiem tylko zmian zachodzących na poziomie spermatogonii, spermatocytów i spermatyd, czy fragmentacja jądrowego DNA zachodzi w fazie spermiogenezy (kondensacja DNA), a może dopiero po opuszczeniu jądra przez plemniki, w drogach wyprowadzających. Dokładne poznanie mechanizmów apoptozy ludzkich plemników wymaga jeszcze dalszych badań.

## PODSUMOWANIE

Bezspornie udowodniono, że brak równowagi pro- i antyoksydacyjnej w nasieniu prowadzi do zaburzeń metabolicznych i czynnościowych męskich komórek rozrodczych. Przypuszcza się, że to może być pierwotną przyczyną powstawania niektórych rodzajów niepłodności. Jedną z przyczyn występowania stresu oksydacyjnego w nasieniu jest stan zapalny w obrębie męskiego układu rozrodczego. Czynniki infekcyjne i uszkodzenie tkanek prowadzą do infiltracji leukocytów, do miejsca toczącej się reakcji zapalnej. Aktywacja leukocytów wiąże się zaś z wytwarzaniem i uwalnianiem dużych ilości RFT oraz uruchomieniem odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko czynnikiem infekcyjnym, obejmującej m.in. wydzielanie wielu aktywnych substancji biologicznych, uczestniczących i nasilających proces zapalny, do których należą proteazy i cytokiny prozapalne. Miejscowe działanie uwalnianych przez leukocyty substancji czynnych w toku toczącej się reakcji zapalnej oraz wzajemne interakcje poszczególnych mediatorów zapalenia (leukocyty, cytokiny prozapalne, bakterie) wydają się interesującym i ostatnio często podejmowanym tematem badawczym, mającym bezpośrednie implikacje praktyczne.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Aitken R.J.: The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int. J. Androl.*, 1989; 12: 95–97
- [2] Aitken R.J.: The human spermatozoon – a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.*, 1999; 115: 1–7
- [3] Aitken R.J., Buckingham D., West K., Wu F.C., Zikopoulos K., Richardson D.W.: Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J. Reprod. Fertil.*, 1992; 94: 451–462
- [4] Aitken R.J., Fisher H.: Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 1994; 16: 259–267
- [5] Aitken R.J., Fisher H.M., Fulton N., Gomez E., Knox W., Lewis B., Irvine S.: Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.*, 1997; 47: 468–482
- [6] Aitken R.J., Harkiss D., Buckingham D.: Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. Reprod. Fertil.*, 1993; 98: 257–265
- [7] Aitken R.J., Irvine D.S., Wu F.C.: Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1991; 164: 542–551
- [8] Aitken R.J., Krausz C., Buckingham D.: Relationship between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol. Reprod. Dev.*, 1994; 39: 268–279
- [9] Aitken R.J., Paterson M., Fisher H., Buckingham D.W., van Duin M.: Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell Sci.*, 1995; 108: 2017–2025
- [10] Alvarez J.G., Storey B.T.: Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.*, 1989; 23: 77–90
- [11] Alvarez J.G., Storey B.T.: Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.*, 1983; 29: 548–555
- [12] Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L., Storey B.T.: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, 1987; 8: 338–348
- [13] Armstrong J.S., Bivalacqua T.J., Chamulitrat W., Sikka S., Hellstrom W.J.: A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. *Int. J. Androl.*, 2002; 25: 223–229
- [14] Baccetti B., Collodel G., Piomboni P.: Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 1996; 28: 587–596

- [15] Baker H.W., Brindle J., Irvine D.S., Aitken R.J.: Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil. Steril.*, 1996; 65: 411–419
- [16] Bhardwaj A., Verma A., Majumdar S., Khanduja K.L.: Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligozoospermic and azoospermic patients. *Asian J. Androl.*, 2000; 2: 225–228
- [17] Bize I., Santander G., Cabello P., Driscoll D., Sharpe C.: Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 1991; 44: 398–403
- [18] Boekelheide K., Fleming S.L., Johnson K.J., Patel S.R., Schoenfeld H.A.: Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 2000; 225: 105–115
- [19] Chen S.S., Chang L.S., Wei Y.H.: Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 30: 1328–1334
- [20] Ciolino H.P., Levine R.L.: Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997; 22: 1277–1282
- [21] Curtin J.F., Cotter T.G.: Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.*, 2003; 15: 983–992
- [22] de Lamirande E., Gagnon C.: A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 1993; 16: 21–25
- [23] de Lamirande E., Gagnon C.: Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993; 14: 157–166
- [24] Ford W.C.: Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update*, 2004; 10: 387–399
- [25] Fraga C.G., Motchnik P.A., Shigenaga M.K., Helbock H.J., Jacob R.A., Ames B.N.: Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1991; 88: 11003–11006
- [26] Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caponecchia L., Familiari G., Verlengia C., Dondero F., Lenzi A.: Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2000; 15: 830–839
- [27] Gavella M., Lipovac V.: NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch. Androl.*, 1992; 28: 135–141
- [28] Giannattasio A., De Rosa M., Smeraglia R., Zarrilli S., Cimmino A., Di Rosario B., Ruggiero R., Colao A., Lombardi G.: Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J. Endocrinol. Invest.*, 2002; 25: 983–986
- [29] Goldman R., Ferber E., Zort U.: Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS Lett.*, 1992; 309: 190–192
- [30] Gomez E., Buckingham D.W., Brindle J., Lanzafame F., Irvine D.S., Aitken R.J.: Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J. Androl.*, 1996; 17: 276–287
- [31] Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z.: Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.*, 1993; 207: 202–205
- [32] Griveau J.F., Renard P., Le Lannou D.: An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int. J. Androl.*, 1994; 17: 300–307
- [33] Halliwell B., Aruoma O.I.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*, 1991; 281: 9–19
- [34] Halliwell B., Chirico S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993; 57(Suppl.5): 715S–724S
- [35] Hansen J.C., Deguchi Y.: Selenium and fertility in animals and man – a review. *Acta Vet. Scand.*, 1996; 37: 19–30
- [36] Hecht D., Zick Y.: Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 188: 773–779
- [37] Herrero M.B., Chatterjee S., Lefevre L., de Lamirande E., Gagnon C.: Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 29: 522–536
- [38] Herrero M.B., de Lamirande E., Gagnon C.: Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 1999; 61: 575–581
- [39] Hildeman D.A.: Regulation of T-cell apoptosis by reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 1496–1504
- [40] Hsieh Y.Y., Sun Y.L., Chang C.C., Lee Y.S., Tsai H.D., Lin C.S.: Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2002; 16: 127–131
- [41] Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J., Thompson W.: A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996; 2: 613–619
- [42] Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J., Thompson W.: The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum. Reprod.*, 1998; 13: 1240–1247
- [43] Jervis K.M., Robaire B.: Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol. Reprod.*, 2001; 65: 696–703
- [44] Jeulin C., Soufir J.C., Weber P., Laval-Martin D., Calvayrac R.: Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.*, 1989; 24: 185–196
- [45] Kao S.H., Chao H.T., Wei Y.H.: Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998; 4: 657–666
- [46] Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972; 26: 239–257
- [47] Kobayashi T., Miyazaki T., Natori M., Nozawa S.: Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1991; 6: 987–991
- [48] Kurpisz M., Miesel R., Sanocka D., Jedrzejczak P.: Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility. *Hum. Reprod.*, 1996; 11: 1223–1226
- [49] Kwenang A., Kroos M.J., Koster J.F., van Eijk H.G.: Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Hum. Reprod.*, 1987; 2: 387–388
- [50] Leclerc P., de Lamirande E., Gagnon C.: Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997; 22: 643–656
- [51] Lee J., Richburg J.H., Younkin S.C., Boekelheide K.: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, 1997; 138: 2081–2088
- [52] Lewis S.E., Donnelly E.T., Sterling E.S., Kennedy M.S., Thompson W., Chakravarthy U.: Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996; 2: 873–878
- [53] Li T.K.: The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol. Reprod.*, 1975; 12: 641–646
- [54] Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G., Casper R.F.: Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1998; 13: 896–900
- [55] McLeod J.: The role of oxygen in metabolism and motility of human spermatozoa. *Am. J. Physiol.*, 1943; 138: 512–518
- [56] Mennella M.R., Jones R.: Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalyzed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochem. J.*, 1980; 191: 289–297
- [57] Mruk D.D., Silvestrini B., Mo M.Y., Cheng C.Y.: Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 2002; 65: 305–311
- [58] Ochsendorf F.R., Buhl R., Bastlein A., Beschmann H.: Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum. Reprod.*, 1998; 13: 353–359
- [59] Peeker R., Abramsson L., Marklund S.L.: Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997; 3: 1061–1066
- [60] Rao B., Soufir J.C., Martin M., David G.: Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.*, 1989; 24: 127–134
- [61] Ratan R.R., Murphy T.H., Baraban J.M.: Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J. Neurochem.*, 1994; 62: 376–379
- [62] Rivlin J., Mendel J., Rubinstein S., Etkovitz N., Breitbart H.: Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, 2004; 70: 518–522
- [63] Saez F., Motta C., Boucher D., Grizard G.: Antioxidant capacity of protosomes in human semen. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998; 4: 667–672

- [64] Saez F., Motta C., Boucher D., Grizard G.: Prostatosomes inhibit the NADPH oxidase activity of human neutrophils. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000; 6: 883–891
- [65] Sakkas D., Manicardi G.C., Tomlinson M., Mandrioli M., Bizzaro D., Bianchi P.G., Bianchi U.: The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum. Reprod.*, 2000; 15: 1112–1116
- [66] Sakkas D., Mariethoz E., St. John J.C.: Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp. Cell Res.*, 1999; 251: 350–355
- [67] Sandstrom J., Karlsson K., Edlund T., Marklund S.L.: Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues. *Biochem. J.*, 1993; 294: 853–857
- [68] Sharma R.K., Pasqualotto A.E., Nelson D.R., Thomas A.J.Jr., Agarwal A.: Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J. Androl.*, 2001; 22: 575–583
- [69] Siciliano L., Tarantino P., Longobardi F., Rago V., De Stefano C., Carpino A.: Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J. Androl.*, 2001; 22: 798–803
- [70] Sinha Hikim A.P., Wang C., Lue Y., Johnson L., Wang X.H., Swerdloff R.S.: Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998; 83: 152–156
- [71] Sun J.G., Jurisicova A., Casper R.F.: Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 1997; 56: 602–607
- [72] Therond P., Auger J., Legrand A., Jouannet P.: alpha-Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996; 2: 739–744
- [73] Thiele J.J., Friesleben H.J., Fuchs J., Ochsendorf F.R.: Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum. Reprod.*, 1995; 10: 110–115
- [74] Tosic J.: Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino acids in sperm motility. *Nature*, 1947; 159: 544–550
- [75] Tramer F., Rocco F., Micali F., Sandri G., Panfili E.: Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1998; 59: 753–758
- [76] Vernet P., Fulton N., Wallace C., Aitken R.J.: Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 2001; 65: 1102–1113
- [77] Wang X., Sharma R.K., Sikka S.C., Thomas A.J.Jr., Falcone T., Agarwal A.: Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 2003; 80: 531–535
- [78] Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R.: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 1980; 68: 251–306
- [79] Yeung C.H., Cooper T.G., De Geyter M., De Geyter C., Rolf C., Kamischke A., Nieschlag E.: Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of *in-vitro* fertilization. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998; 4: 835–839
- [80] Zalata A.A., Christophe A.B., Depuydt C.E., Schoonjans F., Comhaire F.H.: The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998; 4: 111–118
- [81] Zalata A.A., Christophe A.B., Depuydt C.E., Schoonjans F., Comhaire F.H.: White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 1998; 21: 154–162
- [82] Zhang H., Zheng R.L.: Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Radic. Res.*, 1996; 24: 261–268
- [83] Zini A., de Lamirande E., Gagnon C.: Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation *in vitro*. *J. Androl.*, 1995; 16: 424–431
- [84] Zini A., de Lamirande E., Gagnon C.: Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 1993; 16: 183–188