

Received: 2015.10.13
Accepted: 2016.12.16
Published: 2017.05.09

Udział stresu oksydacyjnego w niepłodności żeńskiej oraz w zapłodnieniu metodą *in vitro*

The role of oxidative stress in female infertility and *in vitro* fertilization

Joanna Wojsiat^{1,2}, Jerzy Korczyński³, Marta Borowiecka²,
Halina Małgorzata Żbikowska²

¹Pracownia Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

²Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

³Klinika Medycyny Płodności i Ginekologii, I Katedra Ginekologii i Położnictwa, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Niepłodność jest problemem wielu par w wieku rozrodczym. Szacuje się, że w Polsce 0,7-1,0 miliona par wymaga leczenia, przy czym dla ponad połowy z nich rozród wspomagany jest jedyną rekomendowaną i skuteczną metodą. Problem niepłodności dotyczy 13-15% populacji światowej. Poważnym zagadnieniem jest zmniejszająca się płodność kobiet, która wynika z coraz późniejszego podejmowania przez nie decyzji o zajściu w ciążę. Prowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu jest ważnym czynnikiem w etiopatologii ciąży i wpływa na reprodukcję kobiet po 35 roku życia. Stwierdzono, że stres oksydacyjny może uszkadzać oocyty oraz upośledzać ich zdolność do zapłodnienia, powodować fragmentację zarodków i powstawanie w nich licznych nieprawidłowości rozwojowych, a także może być jedną z ważnych przyczyn poronień samoistnych oraz nawykowych. W ostatnich latach techniki rozrodu wspomaganego medycznie stały się ważnym narzędziem w walce z niepłodnością. Mimo badań mających na celu udoskonalenie zapłodnienia metodą *in vitro*, jej skuteczność jest wciąż niezadowolająca. Znaczny wpływ na powodzenie zapłodnienia metodą *in vitro* może mieć zarówno sposób postępowania w czasie procedury transferu, jak i wiele różnych czynników pochodzących ze środowiska. Poznanie czynników wpływających na powodzenie zapłodnienia metodą *in vitro* może pomóc w zwiększeniu jej skuteczności. Jednym z czynników mających niekorzystny wpływ na zapłodnienie tą metodą jest stres oksydacyjny.

Słowa kluczowe:

stres oksydacyjny • reaktywne formy tlenu • niepłodność żeńska • zapłodnienie *in vitro*

Summary

Infertility problem involves many couples of reproductive age. It has been estimated that in Poland 0.7-1.0 million pairs require treatment, while for more than half of them assisted reproduction is the only recommended and effective method. Infertility affects 13 to 15% of the world's population. A major concern is the age-related decline in female fertility even more that often a decision about pregnancy is taken at later age. Recent studies show that increased production of reactive oxygen species is an important factor in etiopathogenesis of pregnancy and affects female reproduction. It was found that oxidative stress may damage the oocytes and may impair their fertilization capacity. Oxidative stress may also lead to embryo fragmentation

Key words:	and formation of numerous developmental abnormalities, and is regarded to be one of the important reasons of spontaneous and recurrent miscarriage. Moreover, overproduction of reactive oxygen species has a significant impact on the success of in vitro fertilization (IVF). oxidative stress • reactive oxygen species • female infertility • in vitro fertilization
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1237410
DOI:	??
Word count:	3072
Tables:	–
Figures:	2
References:	33

Adres autorki: mgr Joanna Wojsiat doktorant w Pracowni Badań Przedklinicznych o Podwyższonym Standardzie w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. L. Pasteura 3, 02-093, Warszawa; e-mail: jwojsiat@nencki.gov.pl

WSTĘP

Niepłodność została zakwalifikowana przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) do chorób cywilizacyjnych. Obecnie problem dotyczy 13-15% populacji światowej. Szacuje się, że w Polsce 0,7-1,0 miliona par wymaga leczenia, przy czym dla prawie połowy z nich rozród wspomagany jest jedyną rekomendowaną i skuteczną metodą [22,32]. Przyczyny niepłodności mogą zależeć zarówno od kobiety, jak i mężczyzny, a w wielu przypadkach współlistnieją oba czynniki. Poważnym problemem jest coraz mniejsza płodność kobiet, będąca wynikiem podwyższenia granicy wiekowej przy podejmowaniu decyzji o posiadaniu potomstwa. Główną przyczyną związanego z wiekiem spadku płodności jest wzrost nieprawidłowości genetycznych zachodzących w starzejących się komórkach jajowych. Zwiększa to odsetek poronień oraz ryzyko wad wrodzonych u potomstwa. Płodność kobiety obniża się nieznacznie już około 20 roku życia, a wyraźne jej obniżenie obserwuje się około 35 roku życia w związku z gwałtownie zmniejszającą się liczbą pęcherzyków pierwotnych w jajniku. Ryzyko poronienia rozpoznanego, jak i nierozpoznanego u kobiet po 40 roku życia szacuje się na około 75%, podczas gdy przed 30 rokiem życia nie przekracza 7-15% [1].

Proces rozmnażania charakteryzuje się małą wydajnością. Dane literaturowe wskazują, że aż 30-50% ciąży kończy się samoistnym poronieniem przed końcem pierwszego trymestru ciąży, przy czym większość z nich zdarza się już w czasie implantacji zarodka. Poronienia nawykowe występują u 0,5-3% kobiet w rozrodczym przedziale wiekowym, z czego ponad połowę określa się poronieniami idiopatycznymi [22]. Do najczęstszych przyczyn niepłodności żeńskiej należą: zaburzenia owulacji, niedrożność jajowodów, wrodzone i nabyte nieprawidłowości budowy narządu płciowego, zakażenia,

endometrioza. Za jedną z ważnych przyczyn zaburzeń związanych z niepłodnością uważa się występowanie stresu oksydacyjnego.

ZJAWISKO STRESU OKSYDACYJNEGO

Stres oksydacyjny jest wynikiem nadmiernej aktywności reaktywnych form tlenu (RFT), zachodzącej z powodu zachwiania równowagi między ich powstawaniem i usuwaniem przez systemy antyoksydacyjne. Wśród RFT istotne znaczenie ma anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) oraz produkty jego konwersji, takie jak nadtlenuk wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH \cdot) oraz nadtle-noazotyn ($ONOO^-$), który jest reaktywną formą azotu (RFA). RFT i RFA szybko wchodzą w reakcje, w tym łań-cuchowe, reagują z białkami, lipidami, cukrami i kwa-sami nukleinowymi obecnymi w komórkach, powodując powstanie wtórnych produktów wolnorodnikowych. Reaktywne formy tlenu są produktami metabolizmu tle-nowego zachodzącego w komórkach w warunkach fizjo-logicznych. Organizmy żywe wytwarzają RFT w wielu podstawowych procesach biochemicznych, takich jak łań-cuch oddechowy, metabolizm nukleotydów puryno-nych, mikrosomalny cykl hydroksylacyjny (cytochrom P-450), czy cykl przemian kwasu arachidonowego (szlak cyklooksygenazy i lipooksygenazy). Produktem tych reakcji jest najczęściej anionorodnik ponadtlenkowy lub nadtlenuk wodoru.

W warunkach homeostazy, reaktywne formy tlenu odgrywają rolę mediatorów i regulatorów wielu procesów komórkowych [30]. RFT są odpowiedzialne za różnicowanie i apoptozę komórek, wpływają na syntezę, uwalnianie lub inaktywację tlenu azotu oraz pobudzają transport glukozy do komórek. Przez zwiększanie przepuszczalności ścian naczyń włosowatych warunkują prawidłowy przebieg reakcji zapalnej. RFT biorą też udział w regulacji procesów przeka-



zywania sygnałów z komórki do komórki oraz w jej obrębie. Anionorodnik nadadtlenkowy oraz nadadtlenek wodoru ze względu na małą reaktywność, selektywność oraz stałą dostępność w komórce są dobrymi przekaźnikami informacji np. w szlaku cykazy adenylationowej czy fosfolipazy C [30]. RFT mogą również uczestniczyć w hamowaniu funkcji receptorów, głównie tych, które zawierają grupy -SH. Większość białek zawierających grupy tiolowe jest inaktywowana przez RFT, ale znane są też białka, których aktywność w ich obecności wzrasta. Do takich białek zalicza się m.in. cyklazę guanylanową oraz 5-lipooksygenazę, będącą źródłem wolnych rodników generowanych przez pobudzone limfocyty. Enzym ten utlenia wielonienasycone kwasy tłuszczowe, a powstające metabolity utrzymują wewnątrzkomórkową równowagę oksydacyjną aktywując szlaki przekazywania sygnału i ekspresję genów [17].

Wolne rodniki są wytwarzane przez komórki fagocytyczne (granulocyty, monocyty i makrofagi) i wykorzystywane do eliminacji patogenów. Zjawisko to, zwane „wybuchem tlenowym” jest związane z kilkudziesięciokrotnym wzrostem zużycia tlenu i wykorzystaniem go do wytworzenia i uwolnienia dużych ilości anionorodnika nadadtlenkowego – prekursora rodnika hydroksylowego. RFT uczestniczą również w eliminacji pasożytów oraz czynników potencjalnie chorobotwórczych pojawiających się w jamie ustnej. Wyniki badań wskazują, że reaktywne formy tlenu mają udział w regulacji procesów immunologicznych. RFT zwiększają aktywację limfocytów T oraz indukują ich adhezję do śródbłonka, dzięki temu możliwe jest ich przenikanie z układu krążenia do miejsca reakcji zapalnej [17]. Regulatorowe działanie H_2O_2 w niskich stężeniach przejawia się także w aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B, pełniącego rolę aktywatora ekspresji wielu genów. Geny znajdujące się pod kontrolą tego czynnika kodują np. cytokiny (IL-1b czy IL-6), białka odpornościowe, tioredoksynę oraz dysmutazę nadadtlenkową [6,15].

Reaktywne formy tlenu indukują proces apoptozy, umożliwiając eliminację uszkodzonych komórek, które mogą zagrażać organizmowi i doprowadzić do rozwoju choroby nowotworowej. Wpływ wolnych rodników tlenowych na komórki zależy w dużym stopniu od ich stężenia i czasu działania. W małych stężeniach RFT pełnią funkcje fizjologiczne, wyższe stężenia są toksyczne dla komórek i powodują ich uszkodzenie. Im większą reaktywnością odznacza się utleniacz, tym jest mniej wybiórczy w stosunku do cząsteczek będących jego celem [30]. Badania dowodzą, że reaktywne formy tlenu biorą udział w etiologii wielu schorzeń, mają też wpływ na cykl reprodukcyjny kobiet, oddziałując nań przez cały okres życia. Występowanie zjawiska stresu oksydacyjnego obserwuje się w nawracających poronieniach, poronieniach o charakterze idiopatycznym, zaburzeniach embriogenezy oraz w rozwoju płodu. Stres oksydacyjny może też mieć znaczny wpływ na powodzenie zapłodnienia metodą *in vitro*.

UDZIAŁ REAKTYWNYCH FORM TLENU W FUNKCJONOWANIU UKŁADU ROZRODCZEGO KOBIECY

Wiele danych wskazuje, że reaktywne formy tlenu w niewielkich stężeniach są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania żeńskiego układu rozrodczego. RFT jako cząsteczki sygnałowe mają wpływ na wiele procesów fizjologicznych, w tym na zachowanie cykliczności menstruacji i apoptozę komórek jajowych. Mogą też pełnić regulatorową funkcję w dojrzewaniu oocytu, folikulogenezie czy luteolizie [11]. Obecność reaktywnych form tlenu wykryto w płynie pęcherzykowym, oocytach i zarodkach. Stwierdzono także ekspresję genów dysmutazy nadadtlenkowej i peroksydazy glutationowej w oocytach i jajowodach [27]. W prawidłowo funkcjonującym jajniku wykazano obecność dysmutazy nadadtlenkowej, peroksydazy glutationowej oraz produktów peroksydacji lipidów [11]. Badania wykazały, że do właściwego funkcjonowania oocytu i osiągnięcia jego dojrzałości niezbędna jest obecność tlenu [2,3,11]. Zaobserwowano nieprawidłowości w rozwoju komórek jajowych, w środowisku których stężenie tlenu było mniejsze niż 5%. Badania Sugino i wsp. wykazały udział reaktywnych form tlenu w złuszczeniu się endometrium przez ich wpływ na wytwarzanie prostaglandyn $F2\alpha$ [27]. Nadmierne wytwarzanie reaktywnych form tlenu aktywuje czynnik NF- χ B, który wpływa na zwiększenie ekspresji cyklooksygenazy 2, co ostatecznie zwiększa stężenie prostaglandyn $F2\alpha$. Obecność reaktywnych form tlenu i antyoksydantów w endometrium obserwowano zarówno w ciągu całego cyklu menstruacyjnego, jak i w czasie ciąży. Chociaż obecność RFT w kobiecych drogach rodnych została potwierdzona w wielu pracach naukowych, dokładne określenie źródła ich powstawania i znaczenie nadal nie jest wyjaśnione.

NEGATYWNE SKUTKI NADMIERNEGO WYTWARZANIA RFT W ŻEŃSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM

Badania prowadzone przez Kowalkowskiego i wsp. wykazały znaczne zmiany w mitochondriach oocytów spowodowane przez stres oksydacyjny [13]. Mitochondria to jedyne organelle, poza jądrem komórkowym, które mają własny, kolisty DNA (mtDNA). W warunkach, w których stężenie reaktywnych form tlenu w organelach jest zwiększone, np. w wyniku gwałtownego wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w macierzy mitochondrium lub w wyniku upośledzenia mechanizmów antyoksydacyjnych, dochodzi może do nieodwracalnego uszkodzenia mitochondrialnego DNA, peroksydacji ich dwuwarstwy lipidowej oraz uszkodzenia białek. Zmiany prowadzą do całkowitej dysfunkcji mitochondriów i do śmierci komórki [13,30]. Wzrost stężenia RFT wpływa na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, wywołując napływ jonów Ca^{2+} do komórki oraz ich uwalnianie z rezerw komórkowych. Zwiększenie stężenia jonów Ca^{2+} uaktywnia zależne od jonów endonukleazy, które są odpowiedzialne za degradację materiału genetycznego.

DNA mitochondriów jest pozbawiony histonów, co zwiększa jego podatność na uszkodzenia, tym bardziej że w organellach tych reaktywne formy tlenu są wytwarzane w dużych ilościach (m.in. przez wyciek jednoelektronowy podczas łańcucha oddechowego). W wyniku dysfunkcji mitochondriów, RFT przedostają się do wnętrza komórki jajowej, powodując jej uszkodzenia. Uszkodzenie DNA komórki płciowej ma ogromny wpływ na zapłodnienie i jego powodzenie oraz na zachodzącą w późniejszym czasie embriogenezę. Ze względu na to, iż mitochondria są centrum metabolicznym komórki wszelkie zaburzenia w ich funkcjonowaniu mogą powodować spadek stężenia ATP, co ostatecznie zaburza także procesy metaboliczne w komórkach jajowych.

Uszkodzenie komórek jajowych, przez indukowanie apoptozy, może być także spowodowane działaniem H_2O_2 . W uszkodzonych zarodkach, w których wykryto obecność fragmentów cytoplazmy uszkodzonych blastomerów, stwierdzono nasilony proces programowanej śmierci komórki wywołanej działaniem nadtlenu wodoru [28].

Uszkodzenia komórek jajowych mogą być wynikiem nasilonego stresu oksydacyjnego występującego u starszych kobiet. Wraz ze starzeniem się organizmu i komórek jajowych zauważono znaczny spadek stężenia ATP, GSH, a wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Następstwem tych zmian może być uszkodzenie włókien cytoszkieletu komórki jajowej, upośledzenie jej zdolności do zapłodnienia czy wady wrodzone zarodka, jeśli dojdzie do zapłodnienia takiej komórki [28]. Badania Tatone i wsp. nad ekspresją mRNA odpowiednio dla SOD1, SOD2 oraz katalazy w pęcherzykach Graafa, wykazały znaczny spadek stężenia tych enzymów u kobiet powyżej 38 roku życia, w porównaniu z grupą kobiet poniżej 32 roku życia. [29].

Zaburzenie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej organizmu może także spowodować niepłodność o niezidentyfikowanej etiologii. W osoczu kobiet, u których zdiagnozowano ten typ niepłodności, a także kobiet z nawracającymi poronieniami, stwierdzono obniżone stężenie kwasu askorbinowego, α -tokoferolu i GSH; natomiast zarówno w osoczu jak i w płynie pęcherzykowym w obu grupach kobiet wykazano niższy poziom grup tiolowych [26,33]. Ponadto poziom RFT jest znacznie wyższy u kobiet z tymi zaburzeniami aniżeli w grupie kontrolnej. Stres oksydacyjny jest jednym z istotnych czynników etiologicznych nawracających poronień. Simsek i wsp. dowiedli, że wyższe stężenie produktów peroksydacji lipidów i obniżone stężenie witamin antyoksydacyjnych w osoczu, β -karotenu i witaminy E, koreluje z częstszym występowaniem tego schorzenia [26]. Podwyższone stężenie produktów peroksydacji lipidów może mieć także wpływ na występowanie zespołu antyfosfolipidowego i powodować nawracające utraty ciąży [21,31]. Doświadczenia Polaka i wsp. wykazały, że poziom antyoksydantów w płynie pęcherzykowym kobiet charakteryzujących się tym typem niepłodności jest znacz-

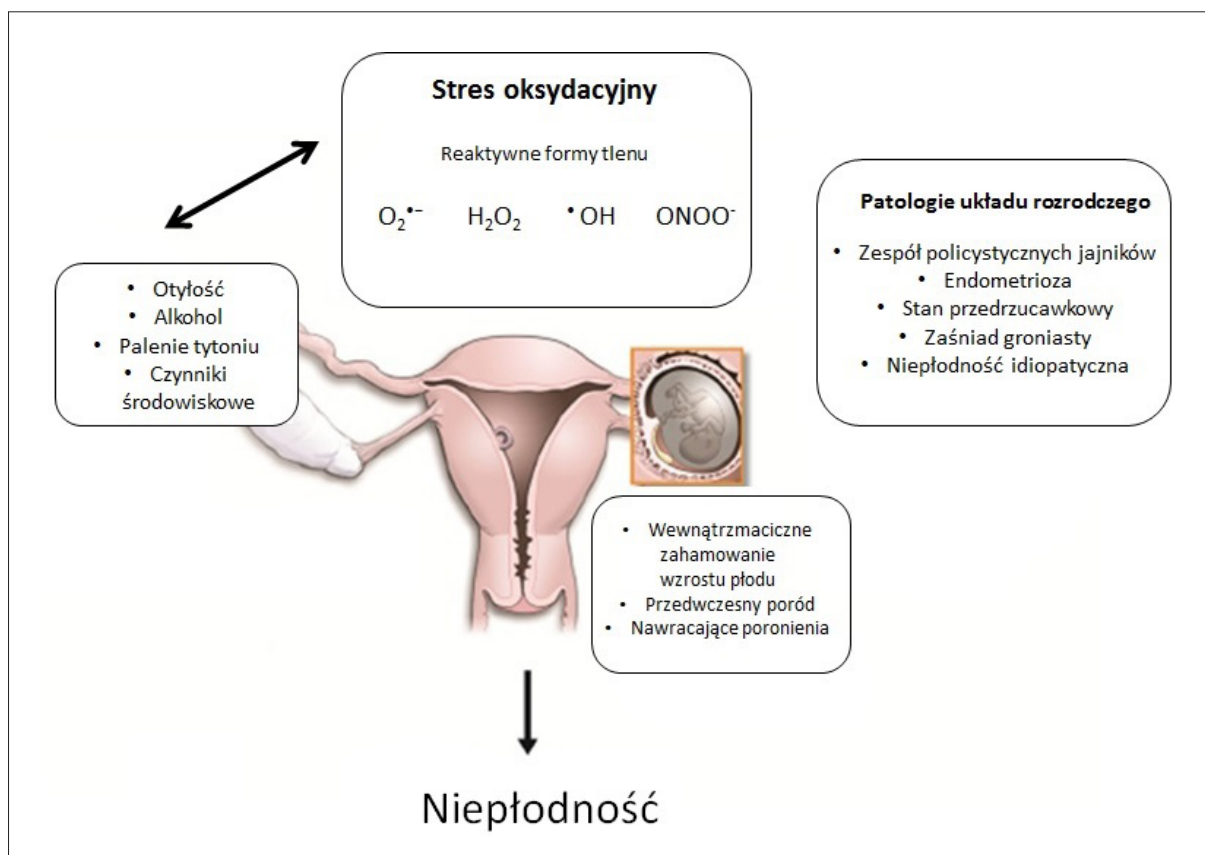
nie niższy w porównaniu z grupą kobiet płodnych. Wyniki tych badań wykazały istotną korelację między spadkiem aktywności peroksydazy glutationowej w osoczu kobiet, a występowaniem u nich spontanicznych poronień [20]. W płynie pęcherzykowym kobiet z nawracającymi poronieniami stwierdzono też obecność produktów peroksydacji lipidów [2].

W czasie organogenezy w łożysku panują warunki anaerobowe - stężenie tlenu jest bardzo niskie. Dzięki temu wytwarzanie RFT jest ograniczone do minimum, co zapobiega uszkodzeniom DNA zarodka. Badania na zwierzętach potwierdziły, że w początkowej fazie rozwoju zarodek rozwija się znacznie szybciej jeśli utrzymywane jest niskie stężenie tlenu [2]. Anaerobowe warunki zachowane w pierwszym trymestrze ciąży przypuszczalnie wpływają korzystnie na rozwój trofoblastu, umożliwiając prawidłowe funkcjonowanie integryn, które kontrolują proliferację i migrację komórek. Wyniki badań wskazują, że nieprawidłowy rozwój łożyska oraz degeneracja trofoblastu mogą być wynikiem działania stresu oksydacyjnego zachodzącego w łożysku, a to może wywołać poronienie, stan przedrzucawkowy, czy wrodzone anomalie rozwojowe płodu [7].

Na powstawanie stresu oksydacyjnego, a także występowanie stanu przedrzucawkowego w ciąży prawdopodobnie ma wpływ wzrost stężenia enzymów: indukowalnej postaci syntazy tlenu azotu (iNOS-1) oraz jednej z izoform oksydazy NADPH, a także wzrost stężenia endoteliny-1 (ET-1), która może znacznie zwiększać wytwarzanie O_2^- (do wzrostu ilości anionorodnika ponadtlenukowego nie dochodzi w wyniku zastosowania antagonisty receptora ET oraz apocyniny, będącej inhibitorem oksydazy NAD(P)H). Badania wskazują, że czynniki te mogą pełnić rolę inhibitorów proliferacji komórek trofoblastu i hamować jego rozwój, a także zwiększać wytwarzanie RFT [12]. Częstym powikłaniem rozwoju ciąży jest występowanie zaśnządu groniastego. W zaburzeniu tym dochodzi do zapłodnienia nieprawidłowej komórki jajowej, która po implantacji w macicy i proliferacji powoduje wadliwy rozwój łożyska. Macica zawiera masy tkanki trofoblastycznej pod postacią pęcherzyków o typowym makroskopowym obrazie przypominającym kiść winogron. Zaśnład groniasty powstaje na skutek zapłodnienia pustej (pozbawionej matczyne go materiału genetycznego) komórki jajowej przez 1 lub 2 plemniki. Poza tym jednym z czynników etiologicznych tego zaburzenia mogą być zmiany wywołane stresem oksydacyjnym. U pacjentek z tym schorzeniem stwierdzono znacznie obniżoną aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz zdolności antyoksydacyjnej, co ostatecznie może uszkodzić DNA oocyta [21]. Zarówno w przypadku występowania stanu przedrzucawkowego, jak i zaśnządu groniastego stwierdza się podwyższone stężenie czynników prozapalnych, takich jak TNF- α oraz IL-6, co może potwierdzać wspólną oksydacyjną etiologię tych schorzeń [21].

W czasie prawidłowo przebiegającej ciąży stężenie homocysteiny w osoczu utrzymuje się na niskim pozio-





Ryc. 1. Czynniki biorące udział w powstawaniu stresu oksydacyjnego oraz jego wpływ na układ rozrodczy kobiety (na podstawie [2], zmodyfikowano)

mie, lecz wiele czynników genetycznych i środowiskowych ma znaczny wpływ na wzrost jej stężenia u kobiet ciężarnych. Uważa się, że homocysteina ma właściwości prooksydacyjne i wzrost jej stężenia może być odpowiedzialny za generowanie stresu oksydacyjnego w organizmie. Zaburzenia metabolizmu homocysteiny mają znaczny wpływ na występowanie poronień samoistnych oraz nawykowych, nieprawidłowości rozwojowych płodu, stanu przedrzucawkowego czy przedwczesnego oddzielania się łożyska. Wykazano, że hiperhomocysteinemia jest jednym z czynników ryzyka występowania poronień nawykowych [3]. Podwyższone stężenie RFT oraz produktów peroksydacji lipidów, a także znacznie obniżoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej stwierdzono ponadto u kobiet ze zdiagnozowaną endometrią [16].

STRES OKSYDACYJNY A ZAPŁODNIENIE METODĄ *IN VITRO*

Techniki rozrodu wspomaganego medycznie są ważnym narzędziem w walce z niepłodnością. Mimo badań mających na celu udoskonalenie zapłodnienia metodą *in vitro*, skuteczność tej metody wciąż jest niezadowolająca. Do ciąży dochodzi najczęściej w około 25-35% zapłodnionych komórek jajowych, przy czym tylko połowa z nich kończy się urodzeniem dziecka. Według Szamatowicza, który w 1987 r. dokonał pierwszego udanego zabiegu *in vitro* w Polsce, istotnym czynnikiem warunkującym

skuteczność pozaustrojowego zapłodnienia jest wiek kobiety. Po zapłodnieniu metodą *in vitro* w ciążę zachodzi średnio 38,7% kobiet poniżej 30 roku życia, 33,1% kobiet w wieku 31-35 lat i 24,1% kobiet w wieku 36-40 lat, natomiast dla kobiet powyżej 40 roku życia odsetek ten spada do 10,1% [14]. Poznanie czynników wpływających na powodzenie zapłodnienia metodą *in vitro* może pomóc w zwiększeniu skuteczności. Jednym z czynników mających niekorzystny wpływ na zapłodnienie metodą *in vitro* jest stres oksydacyjny.

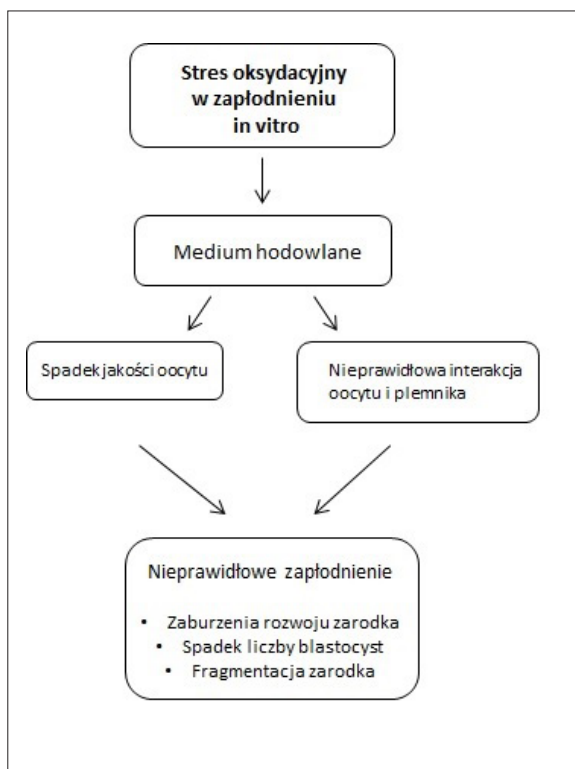
Reaktywne formy tlenu mogą być wytwarzane wewnątrzkomórkowo, bezpośrednio w komórkach rozrodczych bądź zewnątrzkomórkowo i pochodzić z czynników środowiskowych, które towarzyszą procedurze zapłodnienia. Komórki płciowe, podobnie jak komórki somatyczne, jako źródło energii wykorzystują proces glikolizy oraz fosforylacji oksydacyjnej. Wytwarzanie reaktywnych form tlenu zależy od: fosforylacji oksydacyjnej, systemu oksydazy ksantynowej oraz oksydazy NADPH. Badania Manesa i wsp. na myszach dowiodły, że już 4-5 dni po zapłodnieniu w rozwijającej się blastocyste powstają: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy [18]. Różne stadia rozwojowe zarodka charakteryzują się odmiennym poziomem RFT. U myszy RFT są generowane podczas zapłodnienia oraz w fazie G2/M drugiego cyklu podziałowego. Stwierdzono także, że wytwarzanie reaktywnych form

tlenu nie musi zależeć od funkcjonowania mitochondriów. Wyniki badań przeprowadzonych na blastocystach królika wykazały, że cyjanek, który znacząco zaburza funkcjonowanie mitochondriów nie wpływa na poziom tworzenia reaktywnych form tlenu [18]. Wyniki tego doświadczenia dowiodły, że innym źródłem powstawania RFT niezwiązanym z metabolizmem tlenowym mitochondriów jest metabolizm nukleotydów purynowych. Stwierdzono, że w początkowych fazach embriogenezy przemiany nukleotydów purynowych zachodzą dość intensywnie, znacząco wpływając na generowanie zwiększonej ilości reaktywnych form tlenu.

Znaczny wpływ na powodzenie zapłodnienia metodą *in vitro* może mieć zarówno sposób postępowania w czasie procedury transferu, jak i wiele czynników pochodzących ze środowiska. Wyniki doświadczeń Eppiga i wsp. wykazały, że stężenie tlenu podczas procedury zapładniania nie powinno przekraczać 5% [8]. Wyższe stężenie tlenu powodowało nieprawidłowy rozwój zapłodnionego oocytu myszy. Podwyższone stężenie tlenu może aktywować liczne enzymy systemu oksydaz i zwiększać ilość generowanych przez nie RFT, natomiast przy niskim stężeniu tlenu (około 5%) komórki są chronione przed działaniem oksydantów, obniża się stężenie H_2O_2 zapobiegając tym samym fragmentacji DNA i nasilonej apoptozie komórek [12]. Wyniki doświadczeń *in vivo* Orsi i wsp. wykazały, że obniżenie stężenia tlenu wpływa korzystnie na rozwój zarodka myszy oraz na wzrost liczby blastomerów w blastocystach [19]. Guerin i wsp. wykazali, że w środowisku zapłodnienia oocytu w obecności jonów metali przejściowych może dochodzić do generowania reaktywnych form tlenu w reakcjach Fentona i Habera-Weissa. Obecne w medium RFT mogą przenikać do wnętrza komórki jajowej [11]. W celu zapobiegania takim reakcjom do medium dodaje się chelatory, takie jak: EDTA, albumina czy transferyna.

Wiele danych wskazuje, że przedłużony czas ekspozycji embrionów na światło widzialne generuje większe ilości RFT. Światło może indukować stres fotodynamiczny, odpowiedzialny za oksydacyjne uszkodzenia nienasyconych kwasów tłuszczowych i cholesterolu błony komórkowej. Badania Goto i wsp. wykazały, że ekspozycja zarodków myszy na światło widzialne trwająca dłużej niż 5 min powoduje znaczny wzrost stężenia powstającego H_2O_2 [10].

W technice zapłodnienia *in vitro* są wykorzystywane komercyjne media, które w zależności od składu mogą być źródłem RFT i znacznie obniżać jakość oocytu i upośledzać rozwój zarodka. Bardzo często dodawane do medium osocze zawiera albuminę, która pełni rolę chelatora, ale jest źródłem oksydazy ksantynowej odpowiedzialnej za generowanie H_2O_2 . Dodatek antyoksydantów do środowiska przeprowadzanego zapłodnienia może korzystnie wpływać na rozwój zarodka i jego jakość. Wyniki badań Sikka i wsp. wykazały, że witamina C, α -tokoferol, genisteina, tauryna czy hip-



Ryc. 2. Wpływ stresu oksydacyjnego na zapłodnienie *in vitro* i rozwój zarodka (schemat własny)

tauryna dodane do medium biorą udział w usuwaniu wolnych rodników i zapobiegają ich oddziaływaniu na proces zapłodnienia [25].

W zapłodnieniu metodą *in vitro* źródłem RFT może być nasienie. Zwiększona ilość RFT często jest wynikiem zanieczyszczenia nasienia leukocytami. Plemniki są bardzo wrażliwe na uszkodzenia oksydacyjne ze względu na małą aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz dużą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w cytoplazmie. Uszkodzony przez stres oksydacyjny plemnik (np. ze zdegradowanym DNA) negatywnie wpływa na oocyt zarówno w warunkach *in vivo* jak *in vitro*, dlatego też niezbędna jest ocena jakości plemników przed rozpoczęciem inkubacji z oocytem. Uszkodzone i martwe plemniki wytwarzają oksydazę aminową, która reagując ze sperminą bierze udział w tworzeniu H_2O_2 . Wyniki badań sugerują, że wydłużony czas inkubacji komórek jajowych z plemnikami (16-20 godzin) znacznie wzmacnia stres oksydacyjny, zwiększa liczbę nieprawidłowych plemników i tym samym niekorzystnie wpływa na zapłodnienie [24]. Nasilony stres oksydacyjny zauważono także podczas krioprezerwacji gamet. Plemniki poddane krioprezerwacji cechuje znaczne uszkodzenie błony komórkowej, a także znacznie niższe stężenie antyoksydantów oraz większa liczba uszkodzeń DNA (już po 4 godzinach krioprezerwacji). W komórkach jajowych procedura może bardzo zaburzać dojrzewanie oocytów i wywoływać nieprawidłowości w cytokinezie [5]. Badania wykazały także, że



krioprezewacja bydłych plemników miała znaczny wpływ na obniżenie stężenia antyoksydantów, glutationu (o 78%) i aktywności SOD (o 50%) [4]. Ponadto wyniki doświadczeń Alvareza i wsp. dowiodły, że krioprezewacja plemników powoduje wzrost peroksydacji lipidów oraz znaczne obniżenie aktywności SOD w tych komórkach [4].

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach, stres oksydacyjny stał się powszechnie uwzględnianym czynnikiem w wyjaśnianiu patomechanizmu wielu chorób. W badaniach nad niepłodnością często są opisywane przypadki tzw. niepłodności idiopatycznej, w których nie można w sposób jednoznaczny wskazać przyczyny niepowodzenia w rozrodzie. Już pół wieku temu sygnalizowano, że nadmierne wytwarzanie RFT może być szkodliwe dla funkcjonowania męskich i żeńskich komórek płciowych. Istnienie związku między występowaniem stresu oksydacyjnego, a jego udziałem w etiopatologii niepłodności zostało zgodnie potwierdzone przez wielu badaczy.

Standardowa analiza komórek jajowych nie dostarcza danych, koniecznych do określenia stanu płodności kobiety. W związku z tym, duże nadzieje wiąże się z dokładnym poznanie procesów biochemicznych zaangażowanych w złożony proces zapłodnienia, a do nich z pewnością należą układy pro- i antyoksydacyjne, które warunkują prawidłowy proces zapłodnienia. Istnieją wyniki badań, w których wykazano, że suplementacja witaminą C i E kobiet miała korzystny wpływ na zajście w ciążę [2,9]. W celu przeciwdziałania procesom oksydacyjnym w trakcie zapłodnienia metodą *in vitro* należałoby rozważyć dodawanie antyoksydantów (choćby witamin antyoksydacyjnych) do medium, w którym są przechowywane komórki (zarówno oocyty jak i plemniki) oraz unikać warunków i czynników, które mogłyby sprzyjać powstawaniu RFT. Dokładny wpływ stresu oksydacyjnego na powodzenie zapłodnienia metodą *in vitro* oraz na reprodukcję kobiety wciąż nie jest wyjaśniony i bez wątpienia wymaga dalszych badań. Doświadczenia powinny dotyczyć oznaczania parametrów stresu oksydacyjnego w niepłodności i zapłodnieniu pozaustrojowym, jak i badania wpływu antyoksydantów na te procesy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abrao M.S., Muzii L., Marana R.: Anatomical causes of female infertility and their management. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2013; 123: S18-S24
- [2] Agarwal A., Aponte-Mellado A., Premkumar B.J., Shaman A., Gupta S.: The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2012; 10: 49
- [3] Agarwal A., Gupta S., Sharma R.: Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod. Biomed. Online*, 2005; 11: 641-650
- [4] Alvarez J.G., Storey B.T.: Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.*, 1992; 13: 232-241
- [5] Bilodeau J.F., Chatterjee S., Sirard M.A.: Cryopreservation of bovine semen decreases antioxidant defenses in spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1999; 60: 102
- [6] Bonizzi G., Piette J., Merville M.P., Bours V.: Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 59: 7-11
- [7] Burton G.J., Hempstock J., Jauniaux E.: Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reprod. Biomed. Online*, 2003; 6: 84-96
- [8] Eppig J.J., Wigglesworth K.: Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: oxygen concentration. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995; 42: 447-456
- [9] Ferro D., Iuliano L., Violi F., Valesini G., Conti F.: Antioxidant treatment decreases the titer of circulating anticardiolipin antibodies: comment on the article by Sambo et al. *Arthritis. Rheum.*, 2002; 46: 3110-3112
- [10] Goto Y., Noda Y., Mori T., Nakano M.: Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993; 15: 69-75
- [11] Guérin P., El Mouatassim S., Ménéz Y.: Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update*, 2001; 7: 175-189
- [12] Kitagawa Y., Suzuki K., Yoneda A., Watanabe T.: Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 2004; 62: 1186-1197
- [13] Kowalkowski A.J., Vercesi A.E.: Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 26: 463-471
- [14] Krasnodębski J., Ćwiklicki J.: Zapłodnienie pozaustrojowe – temat nadal aktualny. *Gin. Prakt.*, 2009; 17: 36-39
- [15] Li N., Karin M.: Is NF-κB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.*, 1999; 13: 1137-1143
- [16] Liu Y., Luo L., Zhao H.: Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *J. Tongji. Med. Univ.*, 2001; 21: 166-167
- [17] Los M., Dröge W., Stricker K., Baeuerle P.A., Schulze-Osthoff K.: Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25: 159-165
- [18] Manes C., Lai N.C.: Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J. Reprod. Fertil.*, 1995; 104: 69-75
- [19] Orsi N.M., Leese H.J.: Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001; 59: 44-53
- [20] Polak G., Koziol-Montewka M., Gogacz M., Błaszowska I., Kotarski J.: Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2001; 94: 261-263
- [21] Prabha B., Molykutty J., Swapna A., Rajalekshmi T.N., Gangadharan V.P.: Increased expression of interleukin-1 beta is associated with persistence of the disease and invasion in complete hydatidiform moles (CHM). *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 2001; 22: 50-56

- [22] Radwan J.: Epidemiologia niepłodności. W: Radwan J., Wołczyński S. (red.), Niepłodność i rozród wspomagany. Wydawnictwo Termedia, Poznań 2011
- [23] Roberts J.M., Myatt L., Spong C.Y., Thom E.A., Hauth C.J., Leveno K.J., Pearson G.D., Wapner R.J., Varner M.W., Thorp J.M. Jr, Mercer B.M., Peaceman A.M., Ramin S.M., Carpenter M.W., Samuels P. i wsp.: Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 362: 1282-1291
- [24] Saleh R.A., Agarwal A., Nada E.A., El-Tonsy M.H., Sharma R.K., Meyer A., Nelson D.R., Thomas A.J.: Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 2003; 79: 1597-1605
- [25] Sikka S.C.: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.*, 2004; 25: 5-18
- [26] Şimşek M., Naziroglu M., Şimşek H., Cay M., Aksakal M., Kumru S.: Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. *Cell Biochem. Funct.*, 1998; 16: 227-231
- [27] Sugino N., Karube-Harada A., Kashida S., Takiguchi S., Kato H.: Reactive oxygen species stimulate prostaglandyn F2 α production in human endometrial stromal cells *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 2001; 16: 1797-1801
- [28] Tarin J.J., Pérez-Albalá S., Cano A.: Consequences of offspring of abnormal function in ageing gametes. *Hum. Reprod. Update*, 2000; 6: 532-549
- [29] Tatone C., Carbone M.C., Falone S., Aimola P., Giardinelli A., Caserta D., Pandolfi A., Ragnelli A.M., Amicarelli F.: Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006; 12: 655-660
- [30] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 44-84
- [31] Vural P., Akgül C., Yildirim A., Canbaz M.: Antioxidant defence in recurrent abortion. *Clin. Chim. Acta*, 2000; 295: 169-177
- [32] Wołczyński S.: Techniki rozrodu wspomaganego medycznie w leczeniu niepłodności. W: Wołczyński S. (red.), Ginekologia po dyplomie. Medical Tribune Polska; Warszawa 2006
- [33] Zachara B.A., Dobrzyński W., Trafikowska U., Szymański W.: Blood selenium and glutathione peroxidases in miscarriage. *BJOG: Int. J. Gynaecol.*, 2001; 108: 244-247

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

