

Stres oksydacyjny oraz wpływ reaktywnych form tlenowych na funkcję nasienia

MARIA JEDLIŃSKA-KRAKOWSKA

Zespół Patofizjologii Katedry Patologii i Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Jedlińska-Krakowska M.

Oxidative stress and the influence of reactive oxygen species on the function of semen

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are involved in physiological metabolic processes in genital cells, and at the same time are one of the major factors in male sterility. The role of ROS in the physiology and pathology of semen depends on equilibrium between their production and neutralization processes. It is conditioned by the efficiency of antioxidative cell mechanisms and the endo- and exogenous supply of reactive oxygen species. Disorders in this equilibrium in the direction of increasing the reactive oxygen species level produces oxidative stress causing functional disturbances in genital male cells.

Keywords: oxidative stress, semen

Tlen jest pierwiastkiem niezbędnym do życia dla organizmu, stąd też wykorzystywany jest jako ostateczny biorca elektronów w procesie oddychania komórkowego. Wchodząc w reakcje ze związkami organicznymi i pobierając od nich elektrony, tlen sam ulega redukcji. Jest to podstawą zachodzącego w mitochondriach procesu fosforylacji oksydacyjnej, podczas którego powstaje adenosynotryjfosforan (ATP), będący głównym źródłem energii w wielu procesach metabolicznych. Jednakże, jednocześnie z procesami oddychania, na skutek niecałkowitej, jednoelektronowej redukcji zachodzą biochemiczne przemiany tlenu, prowadzące do powstawania reaktywnych form tlenowych (ROS – reactive oxygen species). Część z nich stanowią wysoce reaktywne wolne rodniki tlenowe, zawierające jeden lub więcej niesparowanych elektronów. Dążąc do „sparowania” ilości elektronów uruchamiają one kaskadę reakcji, w których wyniku powstają kolejne wolne rodniki, przy czym cząsteczki mające kontakt z wolnymi rodnikami najczęściej zostają uszkodzone i nie spełniają swych biologicznych funkcji. Stan taki jest określany mianem stresu oksydacyjnego (8, 17).

Oprócz źródeł zewnętrznych, ROS powstają w organizmie jako konsekwencja prawidłowo przebiegających procesów metabolicznych. W związku z tym, w organizmie żywym muszą istnieć układy neutralizujące ROS i zapewniające stan równowagi między procesami oksydacyjnymi i antyoksydacyjnymi. Anoksydanty wchodzące w skład tych układów w warunkach fizjologicznych nie dopuszczają do uruchomienia kaskady reakcji wolnorodnikowych, przerywają te reakcje bądź usuwają z komórek powstające reaktywne metabolity tlenu (5, 10).

Kluczowym elementem uruchomionej kaskady reakcji wolnorodnikowych jest peroksydacja lipidów, powstawanie bioaktywnych molekuł generowanych przez utlenione białka oraz „opróżnienie” komórek narażonych na stres oksydacyjny z antyoksydantów (7). Jednakże w warunkach fizjologicznych, ze względu na krótki półokres trwania i ograniczone możliwości dyfuzyjne, ROS pełnią ważną rolę w regulacji wielu funkcji komórki. Uczestniczą w przekazywaniu sygna-

łów międzykomórkowych, modułują ekspresję genów, aktywują zależnie od potrzeb transkrypcję, proliferację i apoptozę komórek, kontrolują wewnątrzkomórkową homeostazę wapniową, biorą udział w indukowaniu procesów zapalnych i in. (11). Niskie, kontrolowane przez organizm, ilości wolnych rodników tlenowych pełnią też ważną rolę w fizjologii komórek rozrodczych.

Uwalniane w jądrach plemniki, aby stać się dojrzałymi gametami zdolnymi do procesu zapłodnienia, muszą przejść w najądrzach proces kapacytacji. Dochodzi wówczas do przebudowy błony komórkowej, zmiany ilości nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz stosunku cholesterolu do fosfolipidów. Ostatnim etapem procesu dojrzewania jest zmiana sposobu poruszania się plemników zwana hiperaktywacją i reakcja akrosomalna prowadząca do fuzji z komórką jajową. W dojrzewających plemnikach wzrasta koncentracja jonów wapnia, zawartość cAMP oraz zmienia się model fosforylacji białek (16). Stan gotowości do rozpoczęcia tych przemian zależy od reakcji utleniania-redukcji (redox).

Plemniki ssaków są zdolne do spontanicznego generowania ROS i uwalniania ich w ogonie najądrza. Stwierdzono w warunkach *in vitro*, że kapacytacja jest indukowana przez anion nadtlenny, jak również nadtlenek wodoru i tlenek azotu. Plemniki ze wszystkich odcinków najądrzy mogą wytwarzać anion nadtlenny, natomiast nadtlenek wodoru może być generowany tylko przez plemniki przebywające w ogonie najądrza. Te endogenne ROS pośrednio zapoczątkowują i nasilają zależny od ATP szereg reakcji kontrolujących fosforylację tyrozyny, głównie poprzez aktywację cyklicznej adenylowej i zwiększenie dostępności cAMP. Równoważnikami redox są tu NADH/NADPH, których ilość w cytoplazmie również wzrasta. Jednocześnie zarówno anion nadtlenny, jak i nadtlenek wodoru mogą hamować aktywność katalazy i dysmutazy nadtlennej – enzymów wchodzących w skład układu antyoksydacyjnego organizmu (13). ROS mogą również współuczestniczyć, razem z dwuwęglanem sodowym, w alkalizacji pH, niezbędnej do rozpoczęcia procesów prowadzących do aktywacji fizjologicznej funkcji plemników, głównie

hyperaktywacji (3, 16). Końcowym etapem dojrzewania plemników, bezpośrednio poprzedzającym połączenie z oocytem, jest reakcja akrosomalna. Wolne rodniki tlenowe ułatwiają ten proces m.in. stymulując fosfolipazę A2, co prowadzi do fuzji błon i uwolnienia enzymów akrosomalnych. Ponadto, zachodząca przy niskiej koncentracji ROS peroksydacja lipidów zwiększa wiązanie z osłonką przejrzystą (*zona pellucida*) i może wyzwać uwalnianie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych z błony plazmatycznej plemników (13, 14).

Stres oksydacyjny zaburza prawidłową funkcję plemników, stanowiąc jedną z wielu przyczyn samczej niepłodności. Niezwykle istotny dla nabycia i utrzymania przez plemniki zdolności do zapłodnienia jest stan równowagi między wytwarzaniem i neutralizacją wolnych rodników, jak również czas i miejsce ich produkcji. Przy zwiększonej podaży ROS, zarówno pochodzenia egzo-, jak i endogennego czy też w stanie niewydolności systemu antyoksydacyjnego, dochodzi do przesunięcia równowagi w kierunku procesów wolnorodnikowych i do rozwoju stresu oksydacyjnego w komórkach rozrodczych. Pomimo tego, że nasienie posiada zróżnicowany, zależny od gatunku układ obronny przed tego rodzaju stresem, plemniki są komórkami bardzo podatnymi na uszkodzenia tlenowe. Wiąże się to z wysoką zawartością wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w ich błonach plazmatycznych oraz transformacją morfologiczną, podczas której wyzbywają się większości cytoplazmy w postaci kropli cytoplazmatycznej. W konsekwencji, koncentracja cytoplazmatycznych enzymów antyoksydacyjnych jest niska, a ponadto nie wszystkie z nich tam występują (12, 14). Począwszy od stadium spermatocytów pachytenowych aż po spermację, komórki te nie są chronione przez barierę stworzoną przez wypustki komórek Sertoliego. Istotny jest również fakt, że w przeciwieństwie do spermatogonii, pozostałe komórki rozrodcze łącznie z plemnikami mają ograniczoną zdolność naprawy uszkodzeń DNA (6), zaś zwiększona podaż ROS powoduje naruszenie integralności DNA o różnym stopniu natężenia. Przy niemożności naprawy tych uszkodzeń dochodzi do nasilenia procesów apoptozy, która wydaje się głównym regulatorem procesu spermatogenezy zarówno w stanach fizjologii, jak i patologii jąder. Zmniejsza się w ten sposób liczba plemników zdolnych do zapłodnienia, co prowadzi do oligospermii i niepłodności (1). Stwierdzono jednak, że utrzymujący się stan umiarkowanego stresu oksydacyjnego, powodujący fragmentację DNA, nie wpływa na szybkość i skuteczność fuzji plemnik-oocyt. Do spadku wydajności tego procesu dochodzi dopiero przy zmianach struktury błony komórkowej i silniejszym uszkodzeniu genomu. Oznacza to, że plemniki o uszkodzonym DNA są wciąż zdolne do zapłodnienia, co jest przyczyną długofalowych skutków stresu oksydacyjnego (2).

Zwiększona koncentracja ROS indukuje peroksydację lipidów, prowadząc do zaburzeń funkcji, a nawet do śmierci komórki. W wyniku utleniania nienasyconych wiązań kwasów tłuszczowych powstają nadtlenuki kwasów tłuszczowych, a następnie ich keto- i hydroksypochodne. Produkty peroksydacji lipidów (LPO) wykazują tendencje do kumulacji, zaś na skutek rozpadu tworzą pochodne aldehydowe. Jednym z głównych, końcowych produktów tego procesu jest wysoce toksyczny dialdehyd malonowy (10).

Kumulujące się produkty LPO uszkadzają błony komórkowe, nie tylko w miejscu swego powstania. Destabilizacja błon komórek Sertoliego powoduje osłabienie ich połączeń z komórkami rozrodczymi, utratę spermatocytów i spermacyd oraz zbyt wczesne uwalnianie plemników, czyli przedwczesną spermację.

Zdolność generowania wolnych rodników posiadają plemniki prawidłowe, głównie niedojrzałe, co jest elementem przebiegu procesów metabolicznych, jest ona jednak znacznie wyższa u osobników bezpłodnych i z plemnikami morfologicznie nieprawidłowymi. Są więc one, wspólnie z obecnymi w każdym ejakulacie leukocytami, głównym źródłem ROS w męskim układzie rozrodczym. Stwierdzono, że za większość uszkodzeń plemników odpowiada nadtlenuk wodoru. Umiarkowany wzrost stężenia ROS, głównie nadtlenuku wodoru, nie wpływa na żywotność plemników, powoduje natomiast obniżenie ich ruchliwości. Przyczyną jest spadek produkcji i „opróżnienie” komórek z ATP, co prowadzi do upośledzenia fosforylacji białek i uszkodzenia aksonemu witki. Metabolizm energetyczny plemników ulega obniżeniu i to w miejscu niezależnym od tlenowej fosforylacji w mitochondriach (4, 12).

Istnieje prawdopodobieństwo, że nadtlenuk wodoru dyfunduje przez błonę do wnętrza komórki, gdzie poprzez hamowanie aktywności niektórych enzymów doprowadza do spadku produkcji NADPH, gromadzenia się glutationu (zarówno utlenionego, jak i zredukowanego) i dysmutazy nadlenkowej. Prowadzi to do spadku potencjału antyoksydacyjnego plemnika i zwiększenia podatności błonowych fosfolipidów na uszkodzenia przez ROS, a w konsekwencji zmiany struktury błony. Peroksydacja lipidów zmienia również aktywność kluczowych enzymów błonowych i kanałów jonowych, co hamuje ruchliwość, zaburza reakcję akrosomalną i proces łączenia plemnika z oocytem (1, 9, 14, 15).

Podsumowując, można stwierdzić, że uczestniczenie wolnych rodników tlenowych w fizjologii czy też patologii komórki, zależy od utrzymania stanu równowagi pomiędzy ich wytwarzaniem, a neutralizacją w organizmie żywym.

Piśmiennictwo

1. Agarwal A., Saleh R.: Utility of oxidative stress in the male infertility clinic. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2002, 8, 1-9.
2. Aitken R., Gordon E., Harkiss D., Twigg J., Milne P., Jennings Z., Irvine D.: Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1998, 59, 1037-1046.
3. Aitken R.: Possible redox regulation of sperm motility activation. *J. Androl.* 2000, 21, 491-496.
4. Armstrong J., Rajasekaran M., Chamulitrat W., Gatti P., Wayne J., Sikka S.: Characterization of reactive oxygen species induced on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 869-880.
5. Balasińska B.: Ocena stanu oksydo-redukcyjnego w żywych organizmach. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 579-583.
6. Bauche F., Fouchard M., Jegou B.: Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS* 1994, 349, 392-396.
7. Elsayed N.: Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition.* 2001, 17, 828-834.
8. Florjańczyk B.: Pierwiastki śladowe i witaminy w systemie antyoksydacyjnym organizmu. *Annls. Univ. Mariae Curie Skłodowska Sect. DDD.* 1999/2000, XII/XIII, 17, 141-152.
9. Griveau J., Dumont E., Renard P., Callegari J., Lannou D.: Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1995, 103, 17-26.
10. Kleczkowski M., Kluciński W., Sitarzka E., Sikora J.: Stres oksydacyjny i wybrane wskaźniki stanu antyoksydacyjnego zwierząt. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 166-171.
11. Lachance P., Nakai Z., Jeong W.: Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 2001, 17, 835-838.
12. Lamirande E. de, Gagnon C.: Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.* 1995, 10, 15-21.
13. Lamirande E. de, Jiang H., Zini A., Kodama H., Gagnon C.: Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 1997, 2, 48-54.
14. Sharma R., Agarwal A.: Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996, 48, 835-850.
15. Slater T.: Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1984, 105, 283-292.
16. Vernet P., Fulton N., Wallace C., Aitken R.: Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 1102-1113.
17. Wieleba E., Pasternak K.: Pierwiastki śladowe w systemie antyoksydacyjnym zwierząt. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 788-791.

Adres autora: dr Maria Jedlińska-Krakowska, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn; e-mail: maried@uwm.edu.pl