

## SPERMATOZOON ve REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

Bio. Seda YILMAZ<sup>1</sup>, Bio. Olcay ALPAK<sup>2</sup>, Uzm. Dr. Meral KOYUTÜRK<sup>1</sup>

### ÖZET:

Reaktif oksijen türevleri (ROT), biyokimyasal olaylar zincirinde oksijenin organik maddelerle etkileşimi sonucu ortaya çıkan reaktif ara ürünlerdir. ROT'nin fizyolojik mekanizmaların düzenlenmesinde rol aldıkları bilinmektedir. Ancak hücrede, antioksidan kapasiteyi aşan miktarlardaki ROT üretimi, lipid, protein ve DNA hasarına yol açmaktadır. Oksidatif stres olarak tanımlanan bu tablonun birçok hastalığın patojenezinde rol oynadığı bilinmektedir. ROT'nin spermatozoon üzerine etkilerinin anlaşılması erkek kaynaklı infertilite tanısı ve tedavi yöntemlerine yeni yaklaşımlar getirmesi açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Reaktif oksijen türevleri, oksidatif stres, infertilite, spermatozoon.

**Kısa Özet:** Oksijenin biyokimyasal etkileşimleri sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türevlerinin (ROT) spermatozoon üzerine etkilerinin anlaşılması, erkek kaynaklı infertilite tanısı ve tedavi yöntemlerine yeni yaklaşımlar getirmesi açısından önem taşımaktadır.

### SPERMATOZOON AND REACTIVE OXYGEN SPECIES

### SUMMARY

Reactive oxygen species are highly reactive intermediates that are produced during the biochemical processes of oxygen with other organic molecules. Although the generation of ROS are known to have physiologic functions in cells, if levels of ROS production become high enough to overwhelm the antioxidants in these cells, these molecules causes lipid, DNA, and protein damage. This is called as oxidative stress which is considered to be an important factor in the etiology of many pathologic conditions. Understanding the effects of ROS on sperm functions is important to improve new diagnosis and treatment strategies for male factor infertility.

**Key words:** Reactive oxygen species, oxidative stress, infertility, spermatozoon.

**Short Summary:** Understanding the effects of reactive oxygen species (ROS) which are produced during the biochemical processes of oxygen, on sperm functions is important to improve new diagnosis and treatment strategies for male factor infertility.

### REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

Reaktif oksijen türevleri (ROT) oksijen metabolizması sonucunda oluşan metabolitlerdir. Enerjilerini biyolojik moleküllerin oksidasyonu sonucu elde eden birçok aerobik hayvan ve bitki için gerekli olan oksijen, potansiyel olarak toksik bir moleküldür. Biyokimyasal olaylar sırasında organik moleküllerle etkileşir ve çok aktif ara ürünler olan reaktif oksijen türevleri oluşumuna neden olur. Bu türevlere genel olarak serbest radikaller de denir (1). Serbest radikal, bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip çok kısa ömürlü ( $10^{-11}$ - $10^{-9}$  saniye) molekül olarak tanımlanır (2). Kimyasal olarak çok aktif olan bu moleküller hücre için gerekli olan fizyolojik ve metabolik olaylar sı-

rasında oluşmaktadırlar (3). Kontrollü üretildiklerinde birçok farklı hücre tipinde önemli fizyolojik olaylarda rol aldıkları gibi, kontrolsüz üretimleri miyokard enfarktüsü, katarakt ya da romatoid artrit gibi patolojik olayın etiolojisinde rol almaktadır (4).

Biyolojik öneme sahip ROT içerisinde süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), en iyi bilinen moleküldür (5). Süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil serbest radikali ( $\bullet OH$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve perhidroksil ( $HO_2\bullet$ ) radikalleri gibi birçok diğer reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Hidroksil radikalleri, oldukça kısa yarı-ömürü nedeniyle biyolojik sistemlerdeki en potansiyel oksidanlardır (5,6). Çok reaktif olan hidroksil radikalleri çok çeşitli moleküller ile örneğin organik yağların

1 T.C. Kadir Has Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD, İstanbul

2 Adatıp Hastanesi, Tüp Bebek ve İnfertilite Merkezi, Adapazarı

doymamış bağları ile hidrojen ekleyerek ya da çıkararak reaksiyona girerler (7). Hidrojen peroksit, biyolojik olarak çok aktif, membranlardan kolayca difüze olabilen, oksijen-türevli bir ara üründür (8).

## İNSAN SEMENİNDE ROT KAYNAKLARI

### Lökositler

Lökositler, spermatozoon süspansiyonlarında belirlenen ROT'nin primer kaynaklarıdır. Seminal lökosit konsantrasyonu, semen örneğindeki ROT miktarı hakkında %47.9 - %66.5 oranında bilgi verir (9).

Yapılan çalışmalar, lökositlerin ve spermatozoonların ROT üretme mekanizmalarının NADPH oksidaza bağlı indirgeme reaksiyonları ile forbol esterleri ve kalsiyum iyonofor ile stimüle edilmeleri gibi benzer yollar içerdiğini göstermiştir (10). Ancak, lökositler tarafından ROT üretimi, kemotatik peptid N formil metionin lösin fenil alanin (NFMLP) tarafından stimüle edilir. Spermatozoonunda bu peptid için reseptör bulunmamaktadır. Stimülasyon profilindeki bu farklılık kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda lökositlerin ROT üretiminde primer kaynak oldukları gösterilmiştir (11). Lökositler spermatozoonlardan en az 100 kat daha fazla ROT üretmektedirler (12).

### Spermatozoonlar

Erkek germ hücreleri, farklılaşmanın çeşitli evrelerinde, ROT üretme potansiyeline sahiptir (13). İnsan spermatozoonu iki yolla ROT üretir: Spermatozoonun plazma zarındaki nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH) oksidaz sistemi ve mitokondrideki solumun sisteminde bulunan NADPH'a bağlı oksido-reduktaz yolu (14).

Kötü spermatozoon kalitesi ve fazla miktarda ROT üretimi arasındaki ilişki, sitoplazmik artuk varlığına bağlıdır. Bu olay sitoplazmik bir enzim olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G<sub>6</sub>PDH) yoluyla gerçekleşir (15,16). Bu enzim NADPH üretir. Spermatozoon seminifer tubul lümenine salınırken sitoplazmasının büyük çoğunluğunu kaybettiğinden, G<sub>6</sub>PDH miktarı da sınırlanmış olur ve az miktarda ROT üretilir. Sitoplazmik dropletlerin atılmasında meydana gelen defektlerde ise spermatozoonlar daha fazla sitoplazma

dolayısıyla daha fazla G<sub>6</sub>PDH içerirler. Böylece patolojik miktarlarda ROT üretimine neden olabilecek NADPH üretimi gerçekleşir (17).

## SPERMATOZOONLAR ve ROT

Spermatozoon da aerobik koşullarda yaşayan tüm diğer hücreler gibi oksijen kullanır (18). ROT'nin, kontrollü ve belli seviyelerde üretildiklerinde hiperaktivasyon oranını ve spermatozoonun akrozom reaksiyonuna girme yeteneğini regüle etme gibi bazı spermatozoon fonksiyonları üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir (19). Fakat lökositospermi gibi seminal lökosit konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda fazla miktarda ROT üretimi spermatozoon hasarına neden olur (15).

ROT için hücre yapısında yer alan lipidler, proteinler, nükleik asitler ve şekerler potansiyel hedeflerdir (18). ROT'ne bağlı hasar oluşumunda lipid peroksidasyonu önem taşır (20). Lipid peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu gelişmekte ve spermatozoon fonksiyon bozukluklarının etiolojisinde önemli rol oynamaktadır (2). İnsan spermatozoonunun oksidatif strese dolayısıyla ROT'ne karşı duyarlı olmaları, fazla miktarda doymamış yağ asiti içermelerinden kaynaklanmaktadır (21,22). Plazma membranı yağ asitlerinin yaklaşık %60'ı doymamış yağ asitlerinden oluşur (23). Doymamış yağ asitleri, akrozom reaksiyonu gibi membran birleşme fonksiyonlarında membran akışkanlığını sağlamak için gereklidir. Ancak yüksek oranda ki doymamış yağ asitlerinin varlığı, spermatozoonları peroksidatif saldırıya da açık hale getirmektedir (20). Yağ peroksidasyonu plazma membranının yağ fazında değişiklikler meydana getirir (24). Nitekim, ROT'ne maruz kaldıklarında spermatozoonların doymamış yağ asiti içeriği %20'den fazla oranda düşmektedir (23). Membran akışkanlığındaki bu azalmanın sonucu olarak, fazla miktarda ROT'ne maruz kalan spermatozoonlar, membran birleşmesine bağlı olan fonksiyonların hiçbirini gerçekleştiremez (24).

Yağ peroksidasyonu aynı zamanda, normal spermatozoon motilitesi için gerekli olan membran iyon kanallarını da olumsuz yönde etkiler (2). Ayrıca, 4-hidroksinonenal ve malondialdehit gibi, spermatozoon fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri olan zararlı

son ürünlerin açığa çıkmasına da neden olmaktadır (25).

ROT oksidatif stres sonucu DNA bütünlüğünde bozulmaya yol açmaktadır (26). ROT, kromatin yapısında çapraz bağlanmalar (27), DNA baz oksidasyonları (28), DNA iplik kırıkları (29), delesyonlar, baz modifikasyonları ve bazsız bölgelerin oluşumuna neden olmaktadır (26). Yapılan çalışmalar, lökositospermi görülen anormal semen örneklerinde, lökositospermi görülmeyenlere göre iki kattan daha fazla DNA hasarı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, oksidatif stresin DNA hasarına yolaçtığını kanıtlamaktadır (30,31). DNA paketlenmesinde rol alan histonların yerini protaminlerin alması ve disülfid bağların artmasından dolayı spermatozoon DNA'sının nükleer kromatini diğer hücrelere göre daha yoğundur. Bu yüzden de normalde spermatozoon DNA'sı fiziksel ya da kimyasal etkilere daha dirençlidir (32). Fakat subfertil hastalar, spermatozoon DNA'larındaki bozuk kromatin kondensasyonu sebebiyle, ROT'nin oluşturduğu oksidatif hasara daha açıktırlar (33).

ROT, spermatozoonlarda sadece yağ peroksidasyonu ya da DNA hasarı sonucu fonksiyonel kayıplara neden olmaz. Peptitlerin ve protein makromoleküllerin yapı taşları olan aminoasitler de serbest radikaller için potansiyel hedef oluştururlar. Aminoasitlerin oksidasyonu sonucu meydana gelen fiziksel değişiklikler 3 grupta toplanır: Fragmentasyon, agregasyon sekunder ve tersiyer yapı değişikliği sonucu proteolitik sindirime açık hale gelme (34).

ROT, glikolizde bir anahtar enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz inhibisyonuna da neden olur. Bunun sonucu olarak ATP miktarı azalır ve spermatozoonlar immobilize olur (35,36). Spermatozoon metabolizmasında rol alan diğer bir anahtar enzim olan G<sub>6</sub>PDH da ROT'nin varlığından etkilenir (37). Bu enzim hücrede NADPH üretiminde ana metabolik yol olan pentoz-fosfat siklusunun ilk enzimidir. Ayrıca, spermatozoonların antioksidan mekanizmalarının iki anahtar enzimi olan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz da ROT'nin varlığından etkilenir (37,38).

ROT'nin apoptotik hücre ölümünde mediatör rol oynadığı bilinmektedir. ROT mitokondrial membranda permeabilizasyonu artırarak, membranlar arasında

yer alan sitokrom-c nin sitoplazma içerisine salınımına neden olur. Sitolik sitokrom-c, kaspaz zincirinin aktivasyonu sonucu apoptoza yol açar. Spermatojenik hücrelerde de ROT'nin sitokrom-c salınımı sonucunda kaspazları aktive ettiği ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (39). Semen total anioksidan kapasitesi ve ROT düzeylerini skorlayan analiz sistemine (ROS-TAC) göre tanımlanan ROT pozitif bireyler, negatif grupla karşılaştırıldıklarında apoptotik sperm oranlarında artış bulunduğu rapor edilmiştir (40).

Spermatozoon hücrelerinin sitoplazmaları çok az miktarda koruyucu enzim içerdiğinden bu hücreler, ROT tarafından meydana getirilebilecek hasara daha açıktırlar ve seminal plazmanın koruyucu etkisiyle kompanse etmeye çalışırlar (9). Fakat, yardımla üreme teknikleri uygulamalarında semen yıkanarak seminal plazma uzaklaştırıldığından, bu çözüm de yetersiz kalır. Sonuçta, semende belirlenen yüksek ROT konsantrasyonu, spermatozoon konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi gibi birçok semen parametresini olumsuz yönde etkilemektedir (15,18, 41-45).

Tanımlanmış olumsuz etkileri nedeniyle, semende oksidatif stres kaynağı olarak antioksidan kapasiteyi aşan miktarlardaki ROT mevcudiyeti istenmeyen bir durumdur. Yardımla üreme tekniklerinin uygulanması sırasında artmış ROT'nin spermatozoon üzerine olumsuz etkilerini yok etmek ya da en aza indirmek amacıyla yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### KAYNAKLAR

1. Griveau JF, Lannou DL. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Physiology and pathology. *Int J And* 1997; 20: 61-69.
2. Sharma R K, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Clinical review. Urology* 1996; 48(6): 835-850.
3. Yu B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Phy reviews*, 1994, 74, 139.
4. Genova ML, Pich MM, Bernacchia A, et al. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1011: 86-100.
5. Fong KL, McCay PB, Poyer JL. Evidence for superoxide-dependent reduction of Fe<sup>3+</sup> and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation. *Chem Biol Interact*, 1976, 15: 77-89.
6. Hoidal JR. Reactive oxygen species and cell signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25: 661-663.

7. Florence TM. Free radicals, antioxidants and cancer prevention. *Proc Nutr Soc Aust Annu Conf*, 1990, 15: 88-93.
8. Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J*, 1992, 6: 2675-2683.
9. Zalata A, Hafez T, Comhaire F. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 1444-1451.
10. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 459-69.
11. Ford W, Whittington K, Williams AC. Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int J Androl* 1997; 20: 44-49.
12. Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barratt C, Bolton A, Cooke ID. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fert* 1992; 94: 463-470.
13. Fisher HM, Aitken RJ. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool* 1997; 1 277: 390-400.
14. Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol* 1992; 151: 466-77.
15. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy M. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003; 79: 829-843.
16. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J. Reprod Fertil* 1999; 115: 1-7.
17. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. 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: 276-87.
18. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995; 10: 15-21.
19. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med* 1993; 14:157-66.
20. Aitken RJ., Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Devel* 1993; 35: 302-315
21. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 334-46.
22. Fraczek M, Szkutnik D, Sanocka D, Kurpisz M. Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. *Ginekol Pol* 2001; 72: 73-9.
23. Griveau JF, Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20: 61-69.
24. Hargreave TB. *Male Infertility*, Second edition, 1994, 94-103.
25. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 441-50.
26. Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74: 1200-1207.
27. Altman SA, Zastawny TH, Randers-Eichhorn L, Cacciuttolo MA, Akman SA, Dizdaroglu M, Rao G. Formation of DNA-protein cross-links in cultured mammalian cells upon treatment with iron ions. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 897-902.
28. Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Olinski R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett*. 1994; 14 341: 59-64.
29. Abe T, Konishi T, Hirano T, Kasai H, Shimizu K, Kashimura M, Higashi K. Possible correlation between DNA damage induced by hydrogen peroxide and translocation of heat shock 70 protein into the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 17;206: 548-55.
30. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples *J Androl* 2002; 23: 717-723.
31. Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Evenson DP, Agarwal A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002; 78: 319-329.
32. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol*. 1982; 93: 298-305.
33. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*. 1988; 15;44: 52-5.
34. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 1994; 74: 139-162.
35. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13: 368-378.
36. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992; 13: 379-386.
37. Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J. Reprod Fertil* 1995; 103: 17-26.

38. Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 1989; 23: 77-90.
39. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod* 2002; 17: 2665-2672.
40. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Havez MA, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 129-138.
41. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183-197.
42. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res* 1989; 24: 127-134.
43. Armstrong J, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Sikka S. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 869-880.
44. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 1989; 10: 214-220.
45. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-416.