

## SEMİNAL PLAZMA SUPEROKSİD DİSMUTAZ VE TOTAL ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİNE ETKİLERİ

### THE EFFECTS OF SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY AND TOTAL ANTIOXIDANT STATUS IN SEMINAL PLASMA ON MALE INFERTILITY

ÖNER-İYİDOĞAN Y.\*, GENÇ S.\*\*, KOÇAK H.\*\*, AKKUŞ E.\*\*\*

\* İstanbul Üniversitesi Sağlık Hizmetleri M.Y.O. Tıbbi Laboratuvar Programı, İSTANBUL

\*\* İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İSTANBUL

\*\*\* İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

#### ABSTRACT

**Objectives:** Reactive oxygen species (ROS) such as the superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the hydroxyl radical ( $OH$ ) can be produced by spermatozoa or infiltrating leucocytes in human semen. ROS can lead to deleterious effects on some of the sperm parameters including morphology and motility. To counteract the effects of ROS, spermatozoa and seminal plasma possess systems to scavenge ROS and prevent internal cellular damage. The presence of superoxide dismutase (SOD) and of the glutathione peroxidase/reductase system in human semen is well established. Sperm membranes are particularly susceptible to ROS damage because of their high content of polyunsaturated fatty acids. Pro-oxidant and antioxidant balance is vital for normal functioning of cells and some studies have shown that spermatozoa possess antioxidant systems to scavenge ROS. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase/reductase (GPx/GR) and catalase (CAT) enzymatic antioxidant systems were demonstrated by some researchers in semen. Superoxide dismutase acts as a major intracellular protective enzyme against oxygen toxicity by catalasing the ablation of superoxide anion ( $O_2^-$ ).

The aim of our study is to determine the concentrations of superoxide dismutase and total antioxidant capacity in the seminal plasma of fertile and infertile men and observe whether they have any relevance in infertility.

**Material and Methods:** 51 individuals who were admitted to Istanbul University, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Urology were included in the study. Semen samples were liquefied at room temperature for one hour and used for routine sperm analysis according to World Health Organization's (WHO) standards. After liquefaction semen samples were centrifuged to separate seminal plasma. All samples were classified in 3 groups; group 1 was composed of 20 men with normal semen parameters, and considered as fertile group, group 2 was composed of 21 men with at least 2 years of infertility attributed to male factor and with poor semen quality, group 3 was composed of 10 men with azoospermia. Seminal plasma Cu-Zn SOD activity was measured kinetically (Sun et al, 1988) and total antioxidant status (TAS) was determined by colorimetric kit from Randox Laboratories (Antrim,U.K.).

**Results:** The mean value of the SOD activities and TAS levels in seminal plasma of three groups were not different but a significant negative correlation was found between SOD activities and sperm motility in infertile group ( $p=0.048$ ,  $r=-0.435$ ) and there was no significant correlation observed between TAS levels and sperm parameters.

**Conclusion:** These data suggest a significant role for SOD in sperm motility. The SOD activity in the seminal plasma may protect sperm motility against a loss induced by lipid peroxidation and may have an essential role in maintaining sperm motility.

**Key Words:** Superoxide dismutase, Total antioxidant status, infertility

#### ÖZET

Semendeki hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), ve hidroksil radikali ( $OH$ ) gibi reaktif oksijen türevlerinin yapımından spermatozoa hücreleri ve lökositler sorumludur.

İnsan spermatozoa hücreleri ve seminal plazmasında reaktif oksijen türevlerini ortadan kaldıran antioksidan sistemler vardır. Çeşitli araştırmacılar tarafından, spermatozoa hücrelerinde, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksitaz (GPx)/redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) enzimlerinin varlığı gösterilmiştir.

Çalışmanın amacı, fertil ve infertil erkek seminal plazmalarında reaktif oksijen türevlerinden biri olan süperoksit anyonunun  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$ 'e dönüşümünü katalizleyen SOD enziminin aktivitesini ve total antioksidan statüsünü ölçerek kıyaslamak ve bu parametrelerin erkek infertilitesi ile olan ilişkisini araştırmaktır.

I. grup; semen parametreleri normal sağlıklı erkeklerden oluşan fertil grup (n=20), II. grup; en az 2 yıl erkek faktörüne bağlı infertilitesi olduğu bilinen ve sperm parametreleri düşük erkeklerden oluşan infertil grup (n=21) ve III. grup; azospermik erkeklerden (n=10) oluşmaktadır.

Çalışmanın sonuçlarına göre, fertil, infertil ve azospermik grupların SOD aktiviteleri ve Total Antiosidan Status (TAS) düzeyleri kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. İnfertil grupta SOD aktiviteleri ile sperm motiliteleri arasında negatif anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (p=0.048, r=-0.435). SOD aktivitesi ile sperm motilitesi arasında bulunan negatif bağıntı, lipid peroksidasyonuna bağlı olarak geliştiği düşünülen motilite kaybının, SOD aktivitesinin artışı ile önlenilebileceği ve bu antioksidan enzimin sperm motilitisini korumada önemli bir rolü olabileceği sonucunu düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Superoksid dismutaz, total antioksidan kapasite, infertilite

## GİRİŞ

Erkek fertilitesi, yeterli sayıda ve hareketli spermelerin oositlerin zona pellusida tabakasını akrozom reaksiyonu ile bağlayıp, penetre etmesi ve zigotun fertilizasyonu ile gerçekleşmektedir. Sperm gelişimi ve fonksiyonlarını çeşitli faktörler etkiler, bu fonksiyonların herhangi birisinde ortaya çıkabilen bir veya birkaç yetersizlik erkek infertilitesinin başlıca nedenini oluşturmaktadır<sup>1</sup>.

Hidrojen peroksid ( $H_2O_2$ ), süperoksid anyonu ( $O_2^-$ ), ve hidroksil radikali ( $OH$ ) gibi reaktif oksijen türevlerinin (ROS) spermatozoalar tarafından yapıldığı gösterilmiştir<sup>2-4</sup>. Reaktif oksijen türevlerinin sperm hücrelerinin hiperaktivasyonu, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonlarında fizyolojik rol oynadığını gösteren çalışmalar olduğu gibi<sup>5</sup>, sperm hücreleri üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar da yapılmıştır<sup>6</sup>. Elektron transfer reaksiyonlarının bir yan ürünü olan ROS, esas olarak mitokondri ve peroksizomlarda, az miktarda da sitozolde oluşmaktadır ve spermatozoidler de dahil olmak üzere tüm hücre tiplerinde az miktarda sentezlenmektedir. Superoksid oluşumuna neden olan NADPH oksidaz sisteminin sadece belirli kan hücreleriyle sınırlı kalmayıp, daha az uyarılabilen formunun spermatozoalar dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde yaygın olarak açığa çıktığına dair bulgular bulunmaktadır<sup>7</sup>.

Spermatozoa hücrelerinin plazma membranlarının yüksek oranda poliansatüre yağ asiti içerdikleri; bu nedenle reaktif oksijen türevlerinin oluşturacakları hasarlara çok duyarlı oldukları ve bu hücreler için en toksik ROS'nin  $H_2O_2$  olduğu bildirilmiştir<sup>3</sup>.

Hücrelerin normal fizyolojik fonksiyonlarının sürdürülmesinde prooksidan ve antioksidan denge çok önemlidir. Bu dengeyi sağlayan kompleks olaylardan herhangi birinin etkilenme-

si inflamatuvar reaksiyonlar ve otoimmunité gibi patolojik olayların uyarılmasını başlatabilir<sup>8</sup>. İnsan spermatozoa hücreleri ve seminal plazmasında reaktif oksijen türevlerini ortadan kaldıran antioksidan sistemler mevcuttur. Spermatozoa hücrelerinde, Alvarez ve arkadaşları tarafından süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx)/reduktaz (GR) enzimlerinin<sup>9,10</sup>; Jeulin ve arkadaşları tarafından ise katalaz (CAT) enziminin varlığı gösterilmiştir. CAT aktivitesinin seminal plazmada çok düşük olduğu düşünülmektedir<sup>11</sup>.

Reaktif oksijen türevleri oluşumu ile sperm-oosit birleşme kapasitesi arasında negatif ilişki olduğu<sup>2</sup> ve reaktif oksijen türevlerinin fertilizasyon oranını azalttığı çeşitli klinik çalışmalarla gösterilmiştir<sup>4,12</sup>.

Bu çalışmanın amacı, fertil ve infertil erkek seminal plazmalarında reaktif oksijen türevlerinden biri olan süperoksid anyonunun  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'e dönüşümünü katalizleyen SOD enziminin aktivitesini ve total antioksidan kapasiteyi ölçerek; kıyaslamak ve bu parametrelerin erkek infertilitesi ile olan ilişkisini araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Sperm örnekleri infertilite şikayetiyle Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Üroloji Kliniği'ne başvuran yaşları 22-41 arasında 31 kişiden ve yaşları 22-38 arasında değişen çocuk sahibi ve fertil olduğu bilinen 20 sağlıklı kişiden 3 günlük cinsel perhizi takiben masturbasyonla toplanmıştır.

**Çalışma grupları:** I. grup; semen parametreleri normal sağlıklı erkeklerden oluşan fertil grup (n=20), II. grup; en az 2 yıl erkek faktörüne bağlı infertilitesi olduğu bilinen ve sperm parametreleri düşük erkeklerden oluşan infertil grup (n=21) ve III. grup; azospermik erkeklerden (n=10) oluşmaktadır. İnfertil grupta 2 olguda oligo-

spermi, 9 olguda astenoteratospermi, 5 olguda oligoastenozoospermi ve 5 olguda teratospermi saptanmıştır. Sperm morfolojisi Kruger kriterlerine göre değerlendirilmiştir<sup>13</sup>.

**Çalışma materyali:** Semen örnekleri 1 saat oda ısısında likefiye edildikten sonra rutin sperm analizi Dünya Sağlık Örgütü Standartlarına uygun olarak yapılmıştır<sup>14</sup>. Likefikasyonu takiben örnekler 1000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek seminal plazmaları ayrılmış ve çalışma gününe kadar -80 C'de saklanmıştır.

**Yöntemler:** Seminal plazmada Cu-Zn SOD aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür<sup>15</sup>. TAS ise Randox Laboratories LTD (Antirim, U.K.)'in kolorimetrik kinetik kiti kullanılarak çalışılmıştır.

**İstatistiksel değerlendirme:** Mann Whitney-U testi ve Pearson korelasyon testi kullanılarak yapılmıştır.

## SONUÇLAR

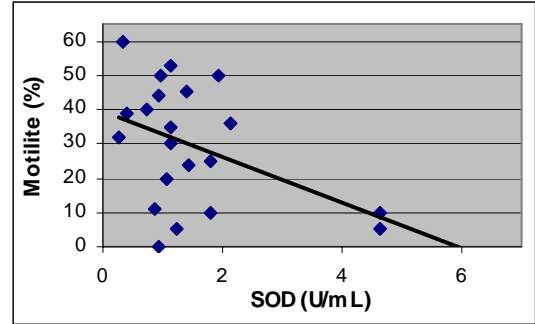
Deney grubunu oluşturan 51 olgudan elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir. Fertil ve infertil hasta gruplarının sperm sayısı, motilite ve normal sperm yüzdeleri kıyaslandığında I. grubun sperm sayısı, motilite ve normal sperm yüzdelerinin II. gruba kıyasla anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p<0.001$ ).

	Fertil Grup	İnfertil Grup	Azospermik Grup
Hasta Sayısı <sup>a</sup>	19	21	10
Toplam Sperm miktarı (10 <sup>6</sup> /ml) <sup>a</sup>	26-96 (66)	1-90 (35) *	—
Motilite (%) <sup>a</sup>	45-75 (60)	0-60 (32) *	—
Normal morfoloji (%) <sup>a</sup>	5-11 (6)	0-6 (2) *	—
SOD (U/ml)	1.35±0.85	1.47 ± 1.16	1.74±0.76
TAS (mmol/L) <sup>b</sup>	1.69±0.25	1.76 ± 0.31	1.96±0.28

**Tablo 1.** Fertil, infertil ve azospermik hastalarda ölçülen sperm parametreleri ile SOD aktivite ve TAS düzeyleri (Değerler (a) dağılım aralığı (medyan) (b) Ortalama±SD olarak tanımlanmıştır. Fertil grup ile kıyaslandığında;  $p<0.001$ )

Fertil, infertil ve azospermik grupların SOD aktivite ve TAS düzeyleri kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

İnfertil grubun SOD enzim aktivitesi ile sperm motilite arasında negatif anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ( $p=0.048$ ,  $r=-0.435$ ) (Şekil 1). TAS düzeyleri ile sperm parametreleri arasında anlamlı bir bağlantı gösterilememiştir.



**Şekil 1.** İnfertil grupta motilite ile SOD aktivitesi arasındaki korelasyon grafiği

## TARTIŞMA

Semendeki reaktif oksijen türevlerinin yapısından spermatozoa hücreleri ve lökositler sorumludur<sup>16,17</sup>. Spermatozoalar tarafından yapılan en önemli reaktif oksijen türevi superoksit anyonudur ve bu anyon SOD enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile hidrojen peroksit oluşturmaktadır<sup>2</sup>. Superoksit anyonundan oluşan hidrojen peroksit seminal plazmada bulunan Cu ve Fe'i kullanarak hidroksil radikale indirgenmektedir. Hidrojen peroksit sperm hücreleri üzerindeki toksik etkisinin diğer oksijen türevlerine kıyasla daha fazla olduğu ve spermatozoa hücrelerinin oositler ile birleşme yeteneğinin ortama eklenen hidrojen peroksit ile azaldığı gösterilmiştir<sup>3</sup>. Hidrojen peroksit toksik etkisi ise katalaz enzimiyle katalize olmasıyla tamamen ortadan kaldırılmaktadır.

Gelişmiş organizmalarda SOD enziminin iki farklı izoenzimi olduğu bilinmektedir. Bunlardan Cu-Zn SOD sitozolde, Mn-SOD mitokondride bulunmuştur<sup>18</sup>. Kobayashi ve arkadaşlarının seminal plazma ve sperm hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada ölçülen SOD aktivitesinin Cu-Zn SOD aktivitesine ait olduğu bildirilmiş ve seminal plazma SOD aktivitesi ile sperm konsantrasyonu ve motilitesi arasında bir bağlantı gösterile-

memiştir<sup>19</sup>. Buna karşılık bizim çalışmamızda infertil olgulardan oluşan grubun SOD aktivitesi fertil gruba kıyasla biraz artmış olmakla birlikte anlamlı bir fark göstermemiş; bu grubun SOD aktivitesi ile sperm motilitesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Sanocka ve arkadaşları oligozospermik hastaların seminal plazmalarında SOD ve CAT aktivitelerinin anlamlı olarak arttığını göstermiştir<sup>8</sup>. Spermatozoal SOD aktivitesinin spermatozoal hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli rolü olduğu bildirilmiştir<sup>9,20</sup>. Seminal plazma SOD aktivitesi ile motil spermatozoa arasında anlamlı bir bağıntı olduğu gösterilmiştir<sup>21</sup>. Bir başka çalışmada bu ilişki sadece spermatozoal SOD aktivitesi ile motilite arasında bulunmuştur<sup>19</sup>. Buna karşılık Hsieh ve ark. spermatozoal ve/veya seminal plazma SOD aktivitesi ile motilite arasında bağıntı bulunmadığını saptamışlardır<sup>22</sup>. Bu farklı sonuçlar kullanılan metodların değişik olması ile açıklanabilir. Bizim çalışmamızda azospermik 10 hastada SOD aktivitesi saptanmıştır. Bu sonuç, seminal plazmadaki SOD aktivitesinin sadece sperm hücrelerinden kaynaklanmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Ayrıca çalışmamızın bulgularına göre üç grubun total antioksidan düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yapılan bir çalışmada spermatozoal malondialdehit (MDA) konsantrasyonu ile hareketsiz spermatozoalar arasında pozitif korelasyon bulunmuş ve ortama eklenen SOD'un motilite kaybını ve MDA konsantrasyonunu azalttığı bildirilmiştir<sup>19</sup>.

SOD aktivitesi ile sperm motilitesi arasında saptadığımız negatif bağıntıya dayanarak, lipid peroksidasyonu sonucunda geliştiği düşünülen motilite kaybının SOD aktivitesinin artışı ile önlendiği ve SOD'un sperm motilitesini korumada önemli rol oynayabilen bir antioksidan savunma enzimi olduğunun düşünülebileceği yargısına varılmıştır.

#### KAYNAKLAR

- 1- **Hull MGR, Glazener CMA, Kelly NJ, et al:** Population study of causes, treatment and outcome of infertility. *Br Med J.* 291:1693-1697, 1985.
- 2- **Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S:** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reproduc.* 40: 183, 1989.
- 3- **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 Reproduc Fert.* 97: 441, 1993.
- 4- **Iwasaki A, Gagnon C:** Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.* 57: 409, 1992.
- 5- **De Lamirande E, Gagnon C:** A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl.* 16: 21, 1993.
- 6- **Aitken RJ, Fisher H:** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. *Bioassays.* 16: 259-267, 1994.
- 7- **Cross AR:** Enzymatic mechanism of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1057: 281-298, 1991.
- 8- **Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, et al:** Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. *Int J Androl.* 20: 255-264, 1997.
- 9- **Alvarez JG, Touchstone CJ, Blasco L, et al:** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.* 8: 338, 1987.
- 10- **Alvarez JG, Storey BT:** Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23: 77, 1989.
- 11- **Jeulin C, Soufir JC, Weber P, et al:** Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24: 185, 1989.
- 12- **D'Agata R, Vicari E, Moncada ML, et al:** Generation of reactive oxygen species in subgroups of infertile men. *Int J Androl.* 13: 344, 1990.
- 13- **Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al:** Predictive value of abnormal sperm morphology in invitro fertilization. *Fertil Steril.* 49: 112-117, 1988.
- 14- **World Health Organization:** WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3<sup>rd</sup> edition, Cambridge, The Press Syndicate the University of Cambridge, 1992.
- 15- **Sun Y, Oberley LW, Li Y:** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 34: 497-500, 1988.
- 16- **Aitken RJ, Buckingham D, West K, et al:** Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fert.* 94: 451, 1992.

- 17- **Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barratt CLR, et al:** Origin of reactive oxygen species in human semen: Spermatozoa or leucocytes? J Reprod Fert. 94: 463, 1992.
- 18- **Fridovich I:** The biology of oxygen radicals. Science. 201: 875-880, 1978.
- 19- **Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, et al:** Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: Superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. Hum Reproduc 6: 987-991, 1991.
- 20- **Alvarez JG, Storey BT:** Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. Biol Reprod. 28: 1129-1136, 1983.
- 21- **Nissen HP, Kreysel HW:** Superoxide dismutase in human sperm. Klin. Wochenschr. 61: 63-65, 1983.
- 22- **Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, et al:** Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. J Clin Lab Anal 16: 127-131, 2002.