

CZU: 616.697-085.256.4

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7442237>

CONCEPTE MODERNE PRIVIND EFECTUL PROTECTOR AL SISTEMELOR ENZIMATICE ANTIOXIDANTE ASUPRA CARACTERISTICILOR MORFOLOGICE ȘI FUNCȚIONALE ALE SPERMATOZOIZILOR

Vladimir ȘEPTIȚCHI, Ana LEORDA

Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie

În rezultatul analizei multilaterale a literaturii de specialitate s-a constatat că sistemele enzimatiche antioxidante, care includ superoxid dismutaza (SOD), glutation peroxidaza (GPX) și catalaza (CAT), pot afecta semnificativ cantitativ și calitativ atât caracteristicile fiziologice, cât și cele morfologice ale spermatozoizilor. Până în prezent, multe aspecte ale efectului antioxidantilor enzimatici asupra parametrilor structurali și funcționali ai spermei sunt discutabile și insuficient studiate. Cu toate acestea, numeroase studii au constatat că antioxidantii enzimatici, în diferită măsură, fiind administrați oral la bărbații infertili, precum și în condiții de congelare, decongelare și depozitare a spermei refrigerate, contribuie la scăderea peroxidării lipidelor și la creșterea conținutului de spermatozoizi în ejaculat, reduc umflarea hipoosmotică, deteriorarea membranei plasmatică, a membranelor interioare și exterioare ale mitocondriilor și a acrozomilor spermatozoizilor, cresc mobilitatea și viabilitatea acestora, precum și parametrii cinetici, reduc fragmentarea ADN-ului, contribuind la creșterea integrității acestuia, reduc reticularea cromatinei, modificările perechilor de baze și microdelețiile cromozomiale.

Cuvinte-cheie: *enzime ale sistemului antioxidant, peroxidarea lipidelor, infertilitate, stres oxidativ, specii reactive de oxigen, congelare/decongelare, material seminal.*

MODERN PERSPECTIVES OF THE PROTECTIVE EFFECT OF ENZYMATIC ANTIOXIDANT SYSTEMS ON THE MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF SPERMATOZOA

As a result of a comprehensive analysis of literature, it was revealed that the enzymatic antioxidant systems, including superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT), have a quantitative and qualitative effect on both physiological and morphological characteristics of spermatozoa. Currently, many aspects of the effect of enzymatic antioxidants on the structural and functional parameters of sperm are insufficiently studied and debatable, however, numerous studies have established that enzymatic antioxidants in varying degrees, both when taken orally in infertile men, and in conditions of freezing, defrosting and cold storage of sperm, contribute to a decrease of LOPs and increase the spermatozoa content in the ejaculate, decrease hypoosmotic swelling, decrease the plasma membrane, the inner and outer mitochondrial membranes and the acrosomes of spermatozoa damage, increase their mobility and vitality, as well as kinetic parameters, decrease DNA fragmentation, contributing to an increase in its integrity, a decrease in chromatin cross-linking, to base pair modifications and chromosomal microdeletions.

Keywords: *enzymes of the antioxidant system, lipid peroxidation, infertility, oxidative stress, reactive oxygen species, freezing/thawing, seminal material.*

Introducere

Infertilitatea masculină este o afecțiune frecventă care cauzează aproximativ 40% dintre problemele de fertilitate, dar în majoritatea cazurilor etiologia ei este necunoscută. Pe de altă parte, stresul oxidativ (SO) este una dintre principalele cauze ale disfuncției spermatozoizilor, care corelează negativ cu sarcina spontană, însă această condiție nu este detectată prin analiza standard a materialului seminal. În consecință, producția excesivă de specii reactive de oxigen, *reactive oxygen species* (ROS), în multe cazuri poate fi asociată cu infertilitatea masculină inexplicabilă [1,2]. Spermatozoizii sunt extrem de sensibili la atacul oxidativ datorită structurii membranare unice, bogate în acizi grași polinesaturați. În plus, este cunoscut faptul că spermatozoizii sunt producători activi de ROS. Deși nu există nicio îndoială cu privire la efectul protector al antioxidantilor enzimatici în raport cu diverși parametri ai spermatozoizilor și cu capacitatea de fertilizare, totuși până în prezent multe aspecte ale efectului acestor antioxidantii asupra parametrilor structurali și funcționali ai spermei rămân insuficient studiate și controversate, în special eficacitatea acestora, privind sperma diferitor specii de animale, interdependența doză-efect, mecanismul de acțiune în diverse condiții etc.

Rezultate și discuții

Infertilitatea masculină și SO

Principalele consecințe pentru spermatozoizi ale leziunii mediate de ROS sunt peroxidarea lipidelor și deteriorarea oxidativă a nucleului (Fig.1). Peroxidarea lipidelor spermatozoizilor determină modificări ale flui-

dității și integrității membranelor lor, provocând defecte în reacția acrozomală și fuziunea spermatozoidelor și ovocitelor. Pe de altă parte, defectele oxidative ale ADN-ului pot fi transmise generației următoare, devenind responsabile pentru tulburările de dezvoltare și susceptibilitatea descendenților la boli. Mai mult ca atât, cercetătorii au demonstrat relația dintre ROS și pierderea motilității spermatozoidelor, deteriorarea ADN-ului nuclear și mitochondrial, precum și implicarea acestora în mai multe boli andrologice [2].

Este cunoscut faptul că concentrațiile mari de ROS pot avea un efect negativ asupra calității spermei, ceea ce duce în cele din urmă la infertilitate. În același timp, concentrațiile scăzute și reglate de ROS joacă un rol fiziologic vital în funcția reproductivă masculină, având un efect pozitiv asupra numărului și indicilor calității spermatozoidelor, influențează benefic hiperactivarea și răspunsul acrosomal, precum și fuziunea spermatozoid-ovocit [3]. În cazul prevalenței ROS asupra sistemelor de apărare antioxidantă, care perturbă echilibrul homeostatic dintre generarea de ROS și activitatea antioxidantă, apar defecte patologice în biomoleculele vitale ale spermatozoidelor, cum ar fi proteinele, acizii nucleici, lipidele și carbohidrații [4].

Spermatozoidii se caracterizează prin niveluri ridicate de lipide în membrana plasmatică, în special sub formă de acizi grași polinesaturați (PUFA) cu duble legături neconjugate între grupările lor metilen, ceea ce reduce puterea legăturii metil carbon-hidrogen, făcând hidrogenul extrem de susceptibil la deteriorarea oxidativă. Deoarece nivelurile intracelulare de ROS cresc necontrolat, acestea inițiază o cascadă de reacții, care duc în cele din urmă la peroxidarea lipidelor, *lipid peroxidation* (LPO) [5], în care se pierde aproape 60% din acizii grași membranari, ceea ce reduce fluiditatea, crescând permeabilitatea nespecifică pentru ioni, precum și suprimarea acțiunii receptorilor membranari și enzimelor.

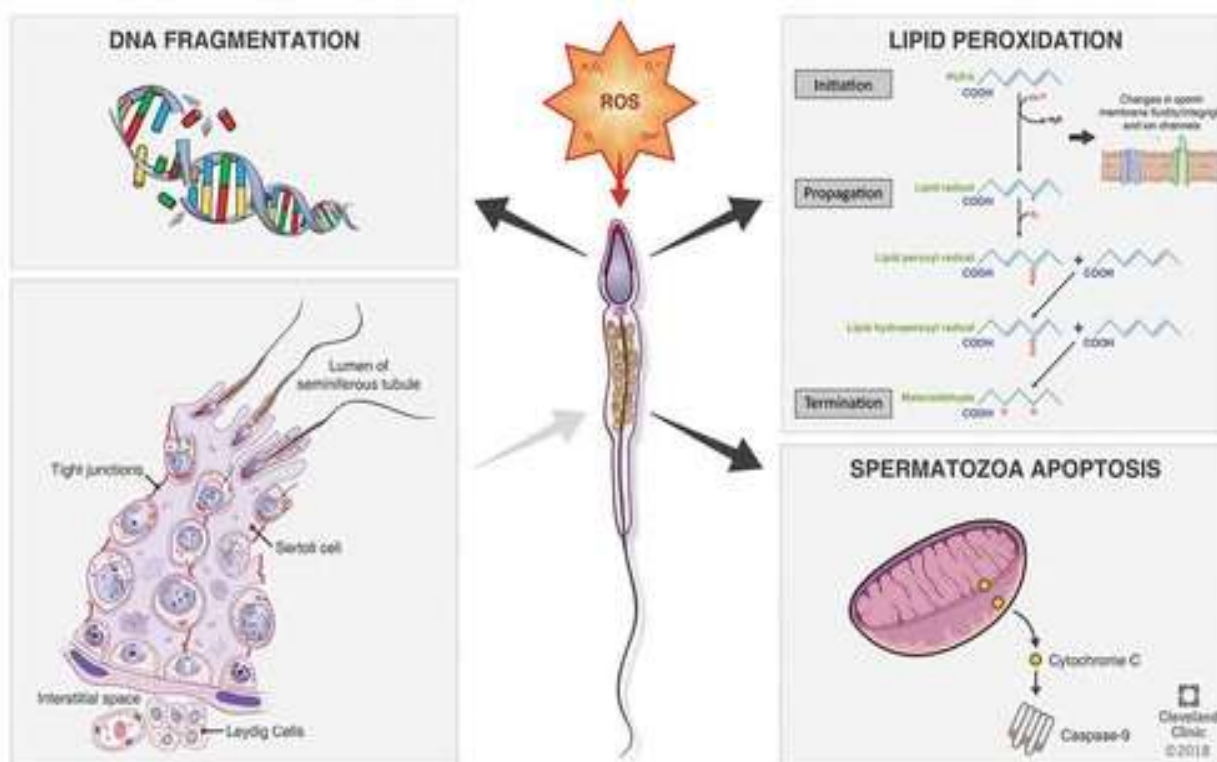


Fig.1. Generarea de ROS în spermatozoizi (după Dutta S. et al., 2019).

Astfel, LPO este o reacție chimică autocatalitică cu autopropagare, iar mecanismul acestei daune oxidative poate derula prin trei etape principale, și anume: inițierea, propagarea și stoparea [1]. Inițierea implică desprinderea atomilor de hidrogen de legăturile duble carbon-carbon, rezultând radicali liberi, care, la rândul lor, formează radicali lipidici și apoi reacționează cu oxigenul pentru a forma radicali peroxil. Aceștia pot îndepărta din nou atomii de hidrogen din lipide, în special când sunt prezente metale precum cuprul și fierul, promovând lanțul autocatalitic. Etapa de propagare a daunelor oxidative continuă atunci când radicalii generați reacționează cu lipidele succesive pentru a forma aldehide citotoxice datorită descompunerii hidroperoxidului. Formarea radicalilor peroxil și alchil se repetă ciclic în această etapă de creștere până când se formează un produs final

stabil, care este malondialdehida (MDA), și în acest moment lanțul de reacție se consideră finalizat. Astfel, MDA este un marker biochimic important pentru analiza și monitorizarea nivelului de deteriorare peroxidică a spermatozoizilor. Un alt produs LPO este 4-hidroxinonenal (4-HNE), care este hidrofil și poate duce la disfuncție severă a spermatozoizilor atât la nivel proteomic, cât și la nivel genomic [1]. Efectele dăunătoare ale ROS asupra ADN-ului nuclear al spermatozoizilor includ: fragmentarea crescută a ADN-ului, legarea încrucișată a cromatinei, modificările perechilor de baze și microdelețiunile cromozomiale. ROS sunt, de asemenea, responsabile pentru reducerea motilității spermatozoizilor prin suprimarea producției de energie prin LPO și, mai important, prin mutațiile AND-ului mitocondrial (mtDNA). Deteriorarea a cel puțin uneia dintre cele 13 gene, care codifică sistemul transportor al lanțului de transport de electroni din mitocondrii, scade producția de ATP și induce producerea de ROS intracelular. ROS poate reduce motilitatea spermatozoizilor, de asemenea, datorită oxidării grupării tiol din gliceraldehidă 3-fosfat dehidrogenază (GAPDH), care este o enzimă glicolică, sau eliminării nucleotidelor de adenină și piridină cu implicarea LPO. ROS sunt capabile să distrugă membranele mitocondriale interioare și exterioare, eliberând citocromul *c*. Ultimul, la rândul său, activează caspazele apoptotice [1,6]. Acest mecanism de inducere a apoptozei spermatozoizilor de către ROS este evident la bărbații infertili, deoarece nivelurile ridicate de citocrom *c* au fost depistate în plasma seminală a bărbaților infertili, ceea ce este un indicator al leziunilor mitocondriale severe.

Antioxidanții enzimatici includ următoarele componente: superoxid dismutaza (SOD), glutatión peroxidaza (GPX) și catalaza (CAT), care sunt exprimate constitutiv în sperma umană [6]. Activitatea lor de captare a radicalilor liberi protejează membrana spermatozoizilor de LPO, păstrând integritatea acestora și, prin urmare, menținând parametrii normali de motilitate și morfologie a spermatozoizilor. Unele studii [4] au dezvăluit, de asemenea, rolul antioxidantilor în protejarea genomului nuclear al spermatozoizilor. Astfel, combinația dintre profilul antioxidant determinat de activitățile SOD, GPX și CAT și biomarkerul LPO – MDA este cel mai bun indicator al SO.

Impactul antioxidantilor enzimatici asupra caracteristicilor morfologice și fiziologice ale spermatozoizilor și indicatorilor SO în plasma seminală

În mai multe studii a fost examinat efectul suplimentării cu antioxidanți asupra parametrilor spermei și indicatorilor SO din plasma seminală [5]. În rezultatul analizei a peste 50 de investigații a fost demonstrat efectul pozitiv al tratamentului antioxidant asupra indicilor SO în spermatozoizii umani [5, 7]. Mai mult ca atât, a existat o îmbunătățire semnificativă a motilității spermatozoizilor, în special la bărbații cu astenospermie. Un alt studiu, realizat de A.Majzoub et al. (2018), a constatat că antioxidanții sunt deosebit de utili în tratarea infertilității masculine asociate cu SO [8]. Printre parametrii variabili ai spermei, motilitatea s-a îmbunătățit în 10 din 16 studii, iar la pacienții cu astenospermie s-a observat o îmbunătățire de 100% a motilității. Antioxidanții nu au afectat morfologia spermatozoizilor și doar trei studii au raportat un efect pozitiv asupra concentrației spermei. În 10 studii a fost studiată rata de fertilizare sau de sarcină, 6 studii raportând îmbunătățiri semnificative. În timp ce 11 din 12 studii au arătat reduceri semnificative ale SO al spermatozoizilor sau ale leziunilor ADN-ului; doar 5 din 10 studii denotă o îmbunătățire a motilității [7].

Este cunoscut că fragmentarea ADN-ului spermatozoizilor *Sperm DNA Fragmentation* (SDF) este un factor important în etiologia infertilității masculine. SDF se corelează negativ cu sarcina în cicluri naturale, cu inseminări intrauterine [9] și proceduri *in vitro* [10]. SDF este, de asemenea, asociat cu avortul spontan recurent [11]. Este bine cunoscut faptul că SDF poate fi prezent la bărbați cu analize atât normale, cât și anormale ale spermei [12] și că bărbații infertili au un număr mai mare de spermatozoizi cu AND-ul afectat decât bărbații fertili. Apoptoza abortivă, infecția, spermatogeneza afectată și SO sunt considerate cauze ale SDF [13], aceasta din urmă fiind cea mai frecventă cauză.

Studiile efectuate de către cercetătorii tunisieni au arătat o asociere între afectarea activității antioxidante a lichidului seminal (concentrații scăzute de SOD, GPX și CAT, creșterea LPO cu fragmentarea ADN-ului și parametrii normali ai spermei, ceea ce indică faptul că o scădere a profilului antioxidant al spermei poate reprezenta un factor de risc pentru deteriorarea ADN-ului spermatozoizilor și apariția anomaliilor spermei. Respectiv, aceste date sugerează că determinarea de rutină a fragmentării ADN-ului spermatozoizilor și a nivelurilor de biomarkeri oxidativi devine recomandată ca un instrument predictiv de încredere pentru evaluarea infertilității masculine. Acest lucru poate ajuta la selectarea probelor de spermă cu cel mai puțin perturbat număr de spermatozoizi și poate reduce riscurile asociate cu utilizarea spermatozoizilor fragmentați ADN pentru fertilizare, ceea ce ar scădea problemele financiare, sociale și emoționale asociate cu încercările eșuate de *in vitro fertilisation* (IVF) [14].

Problema SO în procesul de depozitare a spermei nu a fost rezolvată complet. Efectele antioxidanților asupra răcirii spermei nu sunt bine studiate. SO și stresul nitrozativ apar la un exces de ROS și specii reactive de azot (RAS), la deficiența de antioxidanți sau în ambele cazuri [15]. Fiind păstrate la rece o perioadă îndelungată de timp, în probele de material seminal are loc o creștere a ROS și o scădere a conținutului de antioxidanți [16]. O serie de studii au arătat că adăugarea de SOD în mediul de congelare a spermei, fie de una singură, fie în combinație cu alți antioxidanți, crește motilitatea și viabilitatea spermatozoizilor, în comparație cu grupurile de control la mai multe specii, deși aceste efecte nu întotdeauna sunt observate în cazul câinilor și oilor. Un studiu efectuat pe câini denotă că adăugarea de SOD sau de SOD plus GPX nu a îmbunătățit indicatorii de calitate a spermei în comparație cu grupul de control [17]. Un alt studiu a constatat o corelație pozitivă semnificativă între recuperarea motilității după decongelarea spermei și conținutul de SOD din spermatozoizi [18].

Într-un studiu pe câini a fost investigată corelația dintre starea de SO și parametrii-cheie ai spermatozoizilor, precum și efectul adăugării de SOD, CAT și GPX la tris citratul de glucoză din gălbenușul de ou (EYT-G), un diluent al materialului seminal, timp de 10 zile de depozitare la 4°C. Cei zece câini rasa Boxer au fost împărțiți în două grupe, fertili (F) și hipofertili (H), în funcție de numărul de sarcini ale femelelor și de numărul de nașteri ai descendenților vii în anul precedent. Materialul seminal a fost evaluat în ziua colectării și după 5 și 10 zile de păstrare la rece. Au fost evaluate motilitatea spermatozoizilor, parametrii cinetici și integritatea ADN-ului. S-a elucidat o corelație între statutul oxidativ și parametrii-cheie ai spermei din grupurile F și H. Motilitatea generală și progresivă a fost semnificativ mai mare la cei care primeau rația cu adăugarea de SOD, CAT și GPX, comparativ cu grupurile de control în ziua a 10-a de depozitare a spermei în ambele grupe (F și H), iar în ziua a 5-a de depozitare – numai în grupul H. Integritatea ADN-ului a fost semnificativ mai mare în ambele grupe tratate (H și F) în ziua a 5-a și în ziua a 10-a. Astfel, adăugarea de SOD, CAT și GPX la diluant permite menținerea unei calități ridicate a spermei timp de până la 10 zile la 4°C atât la câinii fertili, cât și la cei hipofertili [19].

Studiile efectuate pe șoareci knockout au arătat că absența chiar și a unei enzime antioxidante în materialul seminal este suficientă pentru a induce un fenotip anormal, deoarece alte componente ale răspunsului antioxidant nu sunt reglementate. De exemplu, absența de glutation peroxidază 4 (mGPX₄) sau peroxiredoxin-6 (PRDX₆) contribuie la infertilitate. Cu toate acestea, și celelalte enzime antioxidante sunt importante, fiind necesare pentru a menține activitatea altora (de exemplu, sistemul TRX (tioredoxină) este indispensabil pentru a menține 2-Cys PRDX activ). Transferul genomului patern în ovul este singurul scop al spermatozoidului; astfel, protejarea ADN-ului spermatozoizilor de deteriorarea oxidativă este importantă, iar multe enzime antioxidante joacă un rol specific în această sarcină. GPX₅ protejează sperma și ADN-ul, nGPX₄ menține niveluri scăzute de H₂O₂ și OHOO – împreună cu peroxidaza PRDX₆ în condiții de deteriorare oxidativă a epididimului. Este de remarcat faptul că activitatea PRDX₆ iPLA₂ este necesară pentru protecția împotriva peroxidării lipidelor, asociate cu motilitatea afectată a spermatozoizilor și cu protecția împotriva produsului său 4-HNE, care poate lega ADN-ul spermatozoizilor și poate genera mutații [20].

Efectul protector al SOD asupra parametrilor spermatici și integrității ADN-ului spermatozoizilor

Studiul activității SOD seminale și al relației sale cu parametrii spermei, precum și al factorilor genetici și negenetici care contribuie la determinarea activității SOD, a fost efectuat cu implicarea bărbaților infertili din China. Probele de material seminal au fost obținute de la 435 de bărbați infertili. Nivelurile de deteriorare a ADN-ului spermatozoizilor au fost determinate cu utilizarea unui test de etichetare a nick-end dUTP mediat de Tdt (TUNEL). S-a descoperit o corelație pozitivă a activității SOD seminale cu concentrația spermatozoizilor și motilitatea lor generală, și negativă – cu fragmentarea ADN-ului spermatozoizilor. Bărbații care au consumat vitamina C/E (≥3 ori pe săptămână) au avut niveluri de activitate SOD semnificativ mai mari, comparativ cu cei care nu au consumat această vitamină. Autorii studiului concluzionează că activitatea SOD a spermei și factorii, care afectează activitatea SOD, joacă un rol determinant în potențialul de fertilizare al spermatozoizilor și în infertilitatea masculină [21].

Într-un studiu al efectului SOD asupra parametrilor materialului seminal de taur s-a demonstrat că adăugarea de SOD a îmbunătățit parametrii spermei, precum și profilurile enzimatică și biochimică ale acesteia, protejând în mod eficient structura și funcția spermatozoizilor. Astfel, SOD poate îmbunătăți calitatea spermei, păstrându-o eficientă în timpul inseminării artificiale. Analiza diversilor parametri ai spermei, cum ar fi: motilitatea progresivă, viabilitatea, integritatea acrozomală, integritatea membranei plasmatică și anomaliile AND, este im-

portantă pentru utilizarea pe scară largă a spermei în procesul de inseminare artificială. Este demonstrat efectul benefic al SOD și asupra conservării spermei, datorat proprietăților sale antioxidante foarte puternice. Deoarece membrana spermatozoizilor la mamifere conține o cantitate mare de PUFA, aceasta face sperma foarte sensibilă la LPO, care apare ca urmare a oxidării lipidelor membranei de către molecule de oxigen parțial reduse, cum ar fi superoxidul, peroxidul de hidrogen și radicalii hidroxil. Peroxidarea lipidică a membranei spermatozoizilor duce în cele din urmă la perturbarea funcției spermatozoizilor din cauza efectelor ROS, la modificări ale motilității și integrității membranei spermatozoizilor, precum și la deteriorarea ADN-ului și a fertilității spermatozoizilor din cauza SO și producerii de aldehide citotoxice. În plus, sistemul antioxidant al plasmei seminale și al spermatozoizilor este perturbat în timpul procesării spermei. Nivelul antioxidant scade în timpul conservării din cauza utilizării diluantului spermei și formării excesive de molecule de ROS. Sistemele antioxidante naturale și sintetice reprezintă un mecanism de apărare împotriva LPO în spermă. Prin urmare, includerea antioxidantilor exogeni, naturali poate reduce efectele SO în timpul procesului de păstrare a materialului seminal și, astfel, poate îmbunătăți calitatea spermei expuse la temperatură joasă. Rezultatele studiului efectului SOD asupra parametrilor materialului seminal de taur au arătat că adăugarea a 100 Un/ml de SOD a îmbunătățit conservarea spermei, care a fost păstrată la 5°C. Motilitatea spermei a scăzut în timpul de păstrare de 30 de ore și a constituit puțin mai mult de 50% din cantitatea inițială. Iar rata de scădere a motilității spermatozoizilor a fost mai mare în probele de spermă tratate cu 150 Un/ml de SOD sau fără SOD. Astfel, calitatea spermei răcite a scăzut în timp, dar a rămas utilizabilă până la 30 de ore, reieșind din motilitate și morfologie. Efectele distincte ale diferitor niveluri de SOD pot fi explicate prin faptul că o cantitate excesivă de antioxidanți determină o permeabilitate ridicată a membranei plasmatică peste punctul dorit, făcând spermatozoizii mai predispuși la deteriorarea acrozomală. În plus, trebuie luată în considerare concentrația de antioxidanți adăugați la diluant, deoarece dozele mari de antioxidanți pot fi dăunătoare pentru celulele spermatozoizilor din cauza modificărilor stărilor fiziologice induse de diluantul spermei. Studiile efectuate pe berbeci au demonstrat că supraviețuirea spermei crește odată cu creșterea dozei de antioxidant adăugat la diluant. Cu toate acestea, supradoza de antioxidant, față de cantitatea necesară, a fost toxică pentru spermatozoizi. Supraexprimarea de SOD poate provoca un defect în dezvoltarea sau maturizarea spermatozoizilor, precum și deteriorarea lor, ceea ce duce la o scădere a potențialului de fertilizare al spermei. În mod similar, în studiul descris, creșterea dozei de SOD până la 150 Un / ml a afectat parametrii seminali, precum și biochimici ai diluantului materialului seminal de taur. În același timp, o doză mai mică a influențat benefic parametrii spermatici. Îmbunătățirea calității spermei odată cu adăugarea de CAT exogen, înregistrată în acest studiu, a fost stabilită anterior și în materialul seminal de cal [22], materialul seminal de taur [23] și în materialul seminal de bivoli [24], și anume: îmbunătățirea mobilității și menținerea membranei acrozomale intacte. Mai mult decât atât, odată cu adăugarea de SOD exogen s-a observat îmbunătățirea semnificativă a morfologiei, viabilității spermatozoizilor, o stare intactă a membranei plasmatică, în special la utilizarea dozei de 100 Un/ml de SOD. Ultima ajută la menținerea integrității acrozomului și stabilizează plasmalema spermatozoizilor, astfel crescând motilitatea lor. SOD în spermatozoizi este capabilă să reacționeze direct cu multe ROS pentru a proteja celulele mamiferelor de SO și, prin urmare, pentru a menține motilitatea spermatozoizilor. S-a demonstrat că SOD, fiind un crioprotector penetrant, acționează ca un antioxidant și determină rearanjarea lipidelor și proteinelor membranei, ceea ce duce la creșterea permeabilității acesteia, la o deshidratare mai mare la temperaturi scăzute și, prin urmare, la capacitatea crescută de supraviețuire a spermatozoizilor în timpul unei astfel de conservări [25]. Acesta poate fi unul dintre motivele îmbunătățirii motilității, viabilității și integrității membranelor plasmatică și a acrozomului, integrității ADN-ului spermatozoizilor, diluați în prezența SOD.

Enzima GPX își exercită efectul antioxidant datorită utilizării formei reduse de glutation (GSH) în calitate de donor de electroni pentru reducerea H_2O_2 în apă [1]. În pofida importanței acestei enzime în reducerea H_2O_2 , există foarte puține cercetări cu privire la efectul său la păstrarea materialului seminal prin răcire cu lichid al spermatozoizilor [26] și doar câteva studii privind folosirea lui în combinație cu alți antioxidanți [16]. În ceea ce privește parametrii de calitate ai spermei după înghețare/dezghetare sub influența GPX, nu au fost obținute rezultate suficient de convingătoare [27]. Pe de altă parte, într-un studiu recent a fost determinat efectul a două doze de CAT (100, 200 μM) asupra motilității, viabilității, LPO, testului de umflare hipoosmotică (HOS), leziunii acrosomilor (AD) și asupra activității SOD la diferite etape ale crioconservării. Probele proaspete de spermă, diluate cu acid tris citric și cu diluant de gălbenuș de ou (TCY) cu CAT (100, 200 μM) sau fără aceasta au fost răcite (pre-congelate), crioconservate și după – dezghetate în conformitate cu procedura standard.

Sperma proaspătă, pre-congelată (PF) și dezghețată (PT) a fost evaluată cu utilizarea testelor funcționale ale spermatozoizilor (motilitate, viabilitate, HOST și AD), activitatea enzimatică LPO și SOD. Rezultatele au arătat că activitatea enzimei SOD, motilitatea procentuală, viabilitatea și HOS au scăzut semnificativ ($P \leq 0,05$), dar LPO și procentul de AD au crescut în timpul etapelor de crioconservare PF și PT. Ambele doze de CAT au îmbunătățit motilitatea, viabilitatea, activitatea HOS și SOD și, de asemenea, au redus peroxidarea lipidelor și deteriorarea acrozomilor în diferite stadii de crioconservare. Acest studiu a mai demonstrat că CAT de 200 μM asigură o protecție mai mare a spermatozoizilor decât 100 μM în timpul crioconservării. S-a ajuns la concluzia că CAT protejează spermatozoizii de SO și, astfel, îmbunătățește testele funcționale ale spermatozoizilor și activitatea enzimei SOD în timpul crioconservării spermei de bivol [28]. Variabilitatea datelor obținute de diferiți autori poate fi explicată, parțial, de diferențele în: protocoalele de depozitare a spermei, componentele diluanților, timpul de adăugare/expunere a antioxidantului la spermatozoizi, concentrațiile de antioxidanți etc. În studiile recente ale cercetătorilor italieni s-a arătat că suplimentarea cu SOD în alimente reduce fragmentarea ADN-ului spermatozoizilor la bărbații infertili într-o măsură mai mare decât o serie de alți antioxidanți, inclusiv preparatele antioxidante utilizate în mod obișnuit [29]. Utilizarea SOD la pacienții infertili selectați aleatoriu a redus fragmentarea ADN-ului în 56% din cazuri, comparativ cu 33% în cazul altor antioxidanți. În același timp, în aceste studii nu s-a constatat nicio îmbunătățire semnificativă a parametrilor clasici ai spermei (numărul total de spermatozoizi, motilitatea lor și parametrii morfologici).

Semnificația activității CAT pentru indicatorii materialului seminal

CAT este o enzimă răspândită, depistată în aproape toate organismele vii expuse acțiunii oxigenului, care protejează celulele de SO, catalizând descompunerea peroxidului de hidrogen (H_2O_2) în apă și oxigen [30]. Moubasher și colab. [31] au investigat efectul protector al CAT asupra parametrilor spermatici și integrității ADN-ului spermatozoizilor în timpul crioconservării. Deși nu a existat o diferență semnificativă în concentrația spermatozoizilor atunci când CAT a fost adăugată în mediu până la crioconservare, totuși, s-a depistat o creștere semnificativă a motilității progresive și a viabilității spermatozoizilor, precum și o reducere semnificativă a daunelor ADN. H_2O_2 este una dintre ROS implicate în SO, proces strâns asociat cu îmbătrânirea și cu anumite probleme de sănătate sau boli, precum infertilitatea masculină. Unele studii au demonstrat legătura H_2O_2 cu infertilitatea masculină, iar a CAT – cu restabilirea fertilității. Cu toate acestea, volumul cercetărilor efectuate cu implicarea subiecților umani este încă destul de mic. Reacția, catalizată cu CAT, joacă un rol nu doar în menținerea nivelului normal de ROS, ci și în protejarea spermatozoizilor de nivelurile potențial toxice de ROS. Aceasta devine o enzimă-cheie în procesele de reproducere și prezintă una dintre cele mai mari eficiențe catalitice descrise până acum: o moleculă de CAT poate converti pe secundă milioane de molecule de peroxid de hidrogen în apă și oxigen. Prin urmare, această reacție previne conversia H_2O_2 în radicali hidroxil și alte ROS mai toxice. Această enzimă prezintă, de asemenea, un grad ridicat de eficacitate în cazul creșterii SO și a fost depistată nu doar în sperma umană, ci și în plasma seminală atât a persoanelor fertile, cât și a celor infertile. Un studiu complex al lui N.Rubio-Riquelme [32] arată că genele antioxidante, inclusiv genele care codifică CAT, joacă un rol important în spermatogeneză și în funcționarea normală a spermatozoizilor. Variațiile genetice ale genelor antioxidante de bază pot modifica predispoziția bărbaților la infertilitate și spermatogeneză defectuoasă. Cu toate acestea, studiul majorității modificărilor, care afectează genele antioxidante, în afară de CAT, s-a limitat în principal la experimentele pe animale [32]. Ca și în cazul cu SOD, efectul pozitiv al CAT este observat și la mai multe specii de animale și se exprimă în special printr-o creștere a motilității spermatozoizilor [26].

Semnificația activității GPX asupra indicilor spermatici

În ultimul deceniu au apărut dovezi valoroase cu privire la importanța sistemului GPX în recircularea ROS în spermatozoizi și rolul său important în fiziologia acestora; în același timp, modelele knockout GPX sunt asociate cu infertilitatea sau subfertilitatea factorului masculin. Cu toate acestea, relația dintre nivelul activității GPX și potențialul de fertilizare al spermatozoizilor nu este încă pe deplin elucidată. Unii autori au examinat activitatea GPX în plasma seminală umană comparând-o cu parametrii normali ai spermei și cu rezultatele IVF. Deoarece enzimele antioxidante din plasma seminală protejează spermatozoizii de efectele toxice ale ROS, iar sistemul GPX este unul dintre cele mai importante mecanisme de apărare, poate fi presupusă o relație între activitatea GPX seminală și funcția spermatozoizilor. În concordanță cu aceasta, rezultatele indică o activitate GPX semnificativ mai mare la pacienții cu normozoospermie decât la pacienții cu disfuncție a

spermei. În particular, a fost depistată o activitate GPX semnificativ mai mică la persoanele cu oligozoospermie severă, astenozoospermie sau teratozoospermie, sugerând implicarea GPX în menținerea calității spermei. Mai mult ca atât, aceste rezultate au fost confirmate de o corelație semnificativă între activitatea GPX și parametrii spermei, în special concentrația și morfologia [2]. Deși o serie de studii au examinat relația dintre plasma seminală umană, GPX și parametrii spermei, rezultatele rămân a fi contradictorii. Au fost raportate niveluri mai scăzute de GPX la bărbații infertili, precum și la pacienții cu astenozoospermie, în timp ce alte studii nu au elucidat nicio asociere între acești parametri și, în mod surprinzător, în rezultatul altor cercetări au fost depistate niveluri mai mari de GPX la bărbații cu oligozoospermie sau astenozoospermie. Aceste discrepante pot fi explicate, posibil, prin variațiile dimensiunii eșantioanelor implicate în cercetare.

Rezultatele studiilor privind activitatea GPX în spermatozoizi, în lichidul seminal și relația acesteia cu parametrii spermatici, obținute de cercetătorii spanioli, denotă o relație semnificativă între parametrii de motilitate, morfologie ai spermatozozilor și activitatea GPX. Cu toate acestea, nu a fost posibilă stabilirea responsabilității nemijlocite a nivelurilor scăzute de GPX în tractul reproducător masculin pentru anomaliile structurale și funcționale menționate mai sus, sau dacă creșterea producției de ROS în spermatozozii anormali și deteriorarea oxidativă ulterioară reduce activitatea GPX în celulele seminale și plasmă. S-a sugerat, însă, că degradarea peroxidică a spermatozozilor poate fi agravată prin tehnici de reproducere asistată, care implică spălarea spermatozozilor, eliminând astfel enzimele prezente în plasma seminală și ulterior supunându-i la incubare prelungită în absența acestor enzime potențial protectoare. Însă adăugarea unui antioxidant în materialul seminal în timpul lichefierii are un efect protector asupra motilității spermatozozilor. Cu toate acestea, în studiul descris, activitatea GPX nu s-a corelat cu rezultatele IVF – *Intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). Potrivit autorilor studiului, acest lucru este deosebit de surprinzător, deoarece nivelurile GPX au fost asociate cu caracteristicile anormale ale spermei, menționate mai sus. Astfel, GPX în plasma seminală este asociată cu calitatea spermei, deoarece s-a demonstrat că activitatea sa în spermatozoizi influențează concentrația, motilitatea și morfologia lor [2].

Concluzii

1. Sensibilitatea ridicată a spermatozozilor la SO, condiționată de nivelul ridicat de lipide din membrana lor plasmatică, în principal sub formă de PUFA, sugerează prezența unor sisteme puternice de apărare împotriva daunelor radicalilor liberi, care duc la infertilitate. Un rol important în asigurarea acestei protecții îl au sistemele de antioxidanți enzimatici, printre care SOD, GPX și CAT, care pot influența semnificativ caracteristicile cantitative și calitative, atât fiziologice, cât și morfologice, ale spermatozozilor.

2. Antioxidanții enzimatici, atât atunci când sunt administrați pe cale orală la bărbații infertili, cât și în condiții de congelare/decongelare și păstrare a spermei în formă frigorifică, contribuie, în diferită măsură, la scăderea LPO, reduc umflarea hipoosmotică, deteriorarea membranei plasmatică, membranelor interioare și exterioare ale mitocondriilor și acrozomilor, cresc conținutul de spermatozoizi în ejaculat, cresc motilitatea și viabilitatea spermatozozilor, parametrii lor cinetici, reduc fragmentarea ADN-ului, contribuind la creșterea integrității acestuia, reduc legarea încrucișată a cromatinei, modificările perechilor de baze și microdelețiile cromozomiale.

3. Eficacitatea sistemelor antioxidante enzimatică în raport cu parametrii spermatici nu este, probabil, aceeași la diferite specii de mamifere. Rolul important al SOD, GPX și CAT în protecția parametrilor morfologici și funcționali ai spermatozozilor în condiții de SO este demonstrat de rezultatele experimentelor pe șoareci knockout în absența uneia dintre enzimele antioxidante, precum și în condițiile activității lor reduce.

Referințe:

1. AGARWAL, A., VIRK, G., ONG, C. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. In: *World J. Mens Health*, 2014, vol.32, p.1-17.
2. CRISOL, L., MATORRAS R., ASPICHUETA, F. et al. Glutathione peroxidase activity in seminal plasma and its relationship to classical sperm parameters and in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome. In: *Fertil. Steril.*, 2012, vol.97, no.4, p.852-857.
3. THOMPSON, A., AGARWAL, A., DU PLESSIS, S.S. Physiological role of reactive oxygen species in sperm function. In: Parekattil SJ, Agarwal A, editors. *Antioxidants in male infertility: a guide for clinicians and researchers*. In: *Springer Science and Business Media*, 2013, p.69-89.

4. AGARWAL, A., SEKHON, L.H. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified? In: *Indian J. Urol.*, 2011, vol.27, p.74-85.
5. DUTTA, S., MAJZOUB, A., AGARWAL, A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. In: *Arab Journal of Urology*, 2019, vol.17, no.2, p.87-97.
6. POTTS, R.J., NOTARIANNI, L.J., JEFFERIES, T.M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. In: *Mutat. Res.*, 2000, vol.447, p.249-256.
7. GHARAGOZLOO, P., AITKEN, R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. In: *Hum. Reprod.*, 2011, vol.26, p.1628-1640.
8. MAJZOUB, A., AGARWAL, A. Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. In: *Arab. J. Urol.*, 2018, vol.16, p.113-124.
9. BUNGUM, M., HUMAIDAN, P., AXMON, A. et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. In: *Hum. Reprod.*, 2007, vol.22, p.174-179.
10. OSMAN, A., ALSOMAIT, H., SESHADRI, S. et al. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. In: *RBM Online*, 2015, vol.30, p.120-127.
11. LEWIS, S.E., AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. In: *Cell. Tissue Res.*, 2005, vol.322, p.33-41.
12. ERENPREISS, J., ELZANATY, S., GIWERCMAN, A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. In: *Asian. J. Androl.*, 2008, vol.10, p.786-790.
13. AITKEN, R.J., WINGATE, J.K., DE IULIIS, G.N. et al. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. In: *Mol. Hum. Reprod.*, 2007, vol.13, p.203-211.
14. ATIG, F., KERKENI, A., SAAD, A., AJINA, M. Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. In: *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2017, vol.34, no.3, p.373-381.
15. LI Y.R., TRUSH, M. Defining ROS in Biology and Medicine. *React. In: Oxyg. Species*, 2016, vol.1, p.9.
16. SILVESTRE, M.A., YÁNIZ, J.L., PEÑA, F.J. et al. Role of Antioxidants in Cooled Liquid Storage of Mammal Spermatozoa. In: *Antioxidants*, 2021, vol.10, p.1096.
17. CHATDARONG, K., CHAIVECHAKARN, A., THUWANUT, P., PONGLOWHAPAN, S. Effects of Cold Storage Prior to Freezing on Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase Activities, Level of Total Reactive Oxygen Species and Sperm Quality in Dogs. In: *Reprod. Domest. Anim.*, 2012, vol.47, p.274-277.
18. BUFFONE, M.G., CALAMERA, J.C., BRUGO-OLMEDO, S. et al. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. In: *Fertil. Steril.*, 2012, vol.97, no.2, p.293-298.
19. PRETE, C.D., CIANI, F., TAFURI, S. Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase supplementation in the extender on chilled semen of fertile and hypofertile dogs. In: *J. Vet. Sci.*, 2018, vol.30, no.5, p.667-675.
20. SCARLATA, E., O'FLAHERTY, C. Antioxidant Enzymes and Male Fertility: Lessons from Knockout Models. In: *Antioxid. Redox Signal.*, 2020, vol.10, no.8, p.569-580.
21. YAN, L., LIU, J., WU, S. et al. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. In: *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2014, vol.31, no.5, p.549-554.
22. COCCHIA, N., PASOLINI, M.P., MANCINI, R. et al. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. In: *Theriogenology*, 2011, vol.75, no.7, p.1201-1210.
23. ASADPOUR, R., JAFARI, R., TAYEFI-NASRABADI, H. The effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of chilled bull spermatozoa. In: *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2012, vol.13, no.3, p.246-249.
24. EL-SISY, G.A., EL-NATTAT, W.S., EL-SHESHTAWY, R.I. Effect of superoxide dismutase and catalase on viability of cryopreserved buffalo spermatozoa. In: *Global Veterinaria*, 2008, vol.2, no.2, p.61-65.
25. HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. In: *Theriogenology*, 2000, vol.53, no.1, p.47-58.
26. MAXWELL, W., STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. In: *Reprod. Fertil. Dev.*, 1996, vol.8, p.1013.
27. ANGRIMANI, D.S.R., SILVA, R.O.C., LOSANO, J.D.A. et al. Extender Supplementation with Antioxidants Selected after the Evaluation of Sperm Susceptibility to Oxidative Challenges in Goats. In: *Anim. Biotechnol.*, 2019, vol.30, p.21-29.
28. BANSAL, A.K., CHEEMA, R.S. Effect of catalase on sperm function tests, lipid peroxidation and superoxide dismutase enzyme activity during cryopreservation of Buffalo Bull. In: *International Research Journal of Natural and Applied Sciences*, 2016, vol.3, p.11.

29. NEGRI, L., BENAGLIA, R., MONTI, E. et al. Effect of superoxide dismutase supplementation on sperm DNA fragmentation. In: *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, 2017, vol.89, no.3, p.212-218.
30. CHELIKANI, P., FITA, I., LOEWEN, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. In: *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, vol.61, p.192-208.
31. MOUBASHER, A.E., EL DIN, A.M., ALI, M.E. et al. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. In: *Andrologia*, 2013, vol.45, p.135-139.
32. RUBIO-RIQUELME, N. et al. Catalase as a Molecular Target for Male Infertility Diagnosis and Monitoring: An Overview. In: *Antioxidants (Basel)*, 2020, vol.9, no.1, p.78.

Notă: Articolul a fost elaborat în cadrul proiectului *Metode și procedee de menținere și conservare a biodiversității în funcție de integritatea gametogenezei și variabilitatea alimentară*, cifrul 20.80009.7007.25.

Date despre autori:

Vladimir ȘEPTIȚCHI, doctor habilitat în științe biologice, conferențiar cercetător; cercetător științific principal, Institutul de Fiziologie și SanoCreatologie.

E-mail: septitchi@mail.ru

ORCID: 0000-0002-6306-7021

Ana LEORDA, doctor în științe biologice, conferențiar cercetător; cercetător științific coordonator, Institutul de Fiziologie și SanoCreatologie.

E-mail: leorda-ana64@mail.ru

ORCID: 0000-0002-2923-8843

Prezentat la 14.06.2022