



УДК616.697-02:616.69-007.5

Вплив препаратів з антиоксидантними властивостями на стан антиоксидантної системи сперматозоїдів при екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків

О.К. Онуфрович, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

При екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків, спричиненій інфекційними агентами, зростає пероксидація ліпідів сперматозоїдів, знижується активність глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази. Прослідковується тісний взаємозв'язок між низькою біологічною якістю сперматозоїдів (низька концентрація, загальна кількість і рухливість сперматозоїдів в еякуляті) з активацією процесів пероксидації ліпідів і пригніченням активності глутатіонової антиоксидантної системи. Негативного впливу активних форм кисню на супероксиддисмутазу не спостерігалося. Курс прийому препаратів з антиоксидантними властивостями (вітамінів E та C), а також цинку сульфату зумовлює поліпшення показників спермограми (в основному рухливості та морфології сперматозоїдів), зменшення кількості пероксидних сполук і активації глутатіонової антиоксидантної системи, що підтверджує перспективність використання цих препаратів у лікуванні чоловічої неплідності.

Ключові слова: чоловіча неплідність; сперматозоїди; глутатіонпероксидаза; глутатіонредуктаза; супероксиддисмутаза; антиоксиданти

Influence of drugs with antioxidant properties on the state of the sperm antioxidant system in men with excretory-toxic forms of infertility

O.K. Onufrovych, D.Z. Vorobets, Z.D. Vorobets

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Since the development of many disorders of the reproductive function in men involves processes of free radical oxidation, the purpose of this study was to form an evaluation of the pro- and antioxidant status of sperm and to restore its biological usefulness in men with excretory-toxic forms of infertility by using drugs with antioxidant properties. It is shown that excretory-toxic forms of infertility in men are mostly caused by such infectious agents as *Chlamydia* (22%), *Chlamydia + Ureaplasma* (16%), *Chlamydia + Trichomonas* (13%), *Ureaplasma* (10%). This reduces the total number of sperm in the ejaculate by 2.7 times, and motility by 1.8 times. The number of abnormal forms increases by 1.75 times. With the development of chronic inflammation of the male sex organs sperm lipid peroxidation increases by 1.3 times while the activity of glutathione peroxidase decreases (by 2.3 times) and that of glutathione reductase (by 1.7 times). We observed a close correlation between the low biological quality of sperm (low concentration, low number and motility of sperm in the ejaculate) with activation of lipid peroxidation and inhibition of activity of the glutathione antioxidant system. In the case of superoxide dismutase, the negative impact of reactive oxygen species on this enzyme was not observed. A course of drugs with antioxidant properties – vitamin E, vitamin C and zinc sulfate leads to improvement in the indicators on the spermiogram (mostly sperm mobility and morphology), to reduction of the number of peroxide compounds and activation of the glutathione antioxidant system. In this case, the activity of glutathione peroxidase is increased by 1.5 times and the activity of glutathione reductase by 1.3 times. The activity of superoxide dismutase at the same time approaches the norm for zoospermia. The data obtained show that one of the pathogenic factors of the chronic inflammation of male sex organs, considered as a main developmental reason for infertility in its excretory-toxic form, is the increase in activity of the peroxide oxygen lipids of the sperm membrane and decompensation of the enzyme activity of the glutathione antioxidant system. Our data indicate that the use as medicines of vitamin E, vitamin C and zinc sulfate combined with antibiotic therapy would be highly effective in the treatment of male infertility.

Keywords: male infertility; sperm; glutathione peroxidase; glutathione reductase; superoxide dismutase; antioxidants

Вступ

У розвитку багатьох порушень репродуктивної функції чоловіків задіяні процеси вільнорадикального окиснення (Aitken and Bennetts, 2007; Agarwal et al., 2008; Vorobets and Kocheshkova, 2008; Aitken and Baker, 2013). Відомо, що сперматозоїдами продукуються активні форми кисню (АФК), які, за їх надлишкового накопичення, ініціюють пероксидне пошкодження клітин (Aitken and Bennetts, 2007; Vorobets and Kocheshkova, 2008). У даний час інтенсивно вивчається роль активних форм кисню у функціонуванні сперматозоїдів у нормі та при патології (Aitken and Bennetts, 2007; Agarwal et al., 2008; Ben Abdallah et al., 2011). Контрольоване продукування дуже низьких концентрацій АФК регулює здатність сперматозоїдів до запліднення (Aitken and Bennetts, 2007; Vorobets and Kocheshkova, 2008). Високий рівень АФК впливає на морфофункціональні показники сперматозоїдів, знижує їх активність та життєздатність, спричинює розвиток чоловічої неплідності (Luconi et al., 2006; Agarwal et al., 2008; Vorobets and Kocheshkova, 2008; Aitken and Baker, 2013). Оксидативний стрес може виникати внаслідок надмірного утворення АФК та при порушенні антиоксидантних захисних механізмів сперматозоїдів та індукувати низку патологій чоловічої репродуктивної системи. У знешкодженні вторинних продуктів пероксидації та інших окиснених речовин головну роль відіграють антиоксидантні ферменти, зокрема глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонредуктаза (ГР), супероксиддисмутаза (СОД) (Calmera et al., 2005; Kawakami and Takemura, 2007; Vorobets and Kocheshkova, 2008).

Визначення активності пероксидації ліпідів у спермі та оцінка систем їх утилізації є важливим етапом розробки терапевтичної стратегії лікування чоловічої неплідності. У зв'язку з важливістю біологічної повноцінності сперматозоїдів здійснювались спроби вивчення можливості корекції морфофункціональних характеристик сперми за допомогою антиоксидантної терапії (Vorobets and Kocheshkova, 2008; Biswas et al., 2009; Yousef, 2010; Ben Abdallah et al., 2011; Jerysz and Lukaszewich, 2013).

Тому мета нашого дослідження – оцінити про- та антиоксидантний статус сперматозоїдів, корекцію їх біологічної повноцінності у чоловіків з екскреторно-токсичною формою неплідності за допомогою препаратів з антиоксидантними властивостями.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводили на зразках еякулятів, отриманих у практично здорових чоловіків ($n = 20$) та чоловіків з амнестичними даними про перенесені або рецидивні уrogenітальні інфекції ($n = 67$), віком 20–47 років. Залежно від проведеного лікування еякуляти пацієнтів поділено на групи:

– група 1 (контрольна, $n = 20$) – еякуляти практично здорових чоловіків, віком 20–47 років;

– група 2 ($n = 67$) – еякуляти чоловіків з екскреторно-токсичною формою неплідності, до початку лікування;

– група 3 ($n = 35$) – еякуляти пацієнтів, яким призначали базисне лікування, включало антибактеріальну протизапальну (етіотропну, патогенетичну), фізіо- та імунокоригувальну терапію (для підвищення неспецифічної резистентності організму);

– група 4 ($n = 32$) – еякуляти пацієнтів, яким призначали базисне лікування + препарати з антиоксидантними властивостями (вітамін Е по 600 мг/день, вітамін С по 500 мг/день), а також цинку сульфат по 250 мг/день; ці препарати, як рекомендовано, пацієнти приймали перорально протягом 3 місяців (Sen et al., 2006; Vorobets and Kocheshkova, 2008; Biswas et al., 2009; Yousef, 2010; Ben Abdallah et al., 2011; Jerysz and Lukaszewich, 2013).

Відповідні діагнози встановлювали на базі загально-визнаних критеріїв. Використано широкий комплекс загальноклінічних, лабораторних, спеціальних урологічних, інструментальних, мікробіологічних, імунологічних досліджень із метою виявлення причини неплідності.

Аналіз сперми включав такі параметри: об'єм та pH сперми; рухливість, концентрація та морфологічні характеристики сперматозоїдів. Дослідження морфологічних особливостей сперми ґрунтувалось на використанні методу Eliasson (1971). У праці використано критерії ВООЗ для оцінки морфологічних характеристик сперми (WHO).

Для отримання відмитих сперматозоїдів готували суспензію, об'ємом 5 мл (сперма + середовище відмивання ($pH 7,6$): $NaCl - 140$ мМ, $KCl - 4$ мМ, $TRIS - 50$ мМ). Суспензію центрифугували при 1 700 g, 15 хв. Після цього супернатант виливали, а осад ресуспензували в 2 мл охолодженого середовища відмивання та центрифугували при 1 700 g, 15 хв. Останню процедуру повторювали двічі. Отримані таким чином відмиті сперматозоїди поміщали в морозильну камеру при $t = -20$ °С для подальшого використання у дослідках.

Для розкриття глутатіонпероксидазної, глутатіонредуктазної та супероксиддисмутазної латентної активностей до суспензії сперматозоїдів додавали 0,2% розчин сапоніну. Вміст білка визначали методом Lowry et al. (1951). Глутатіонпероксидазну активність визначали за розвитком кольорової реакції з 5,5-дітіо-біс(2-нітробензойною кислотою (ДТНБК) з утворенням кольорового продукту тіонітрофенільного аніона (ТНФА), кількість якого прямо пропорційна кількості SH -груп, які прореагували з ДТНБК (Mannervik, 1971). Глутатіонредуктазну активність суспензії сперматозоїдів визначали спектрофотометрично при 340 нм в 0,2 М калійфосфатному буфері ($pH 7,0$), який містив 2 мМ ЕДТА. Супероксиддисмутазну активність визначали за Calmera et al. (2005) та Kawakami and Takemura (2007). Інтенсивність ПОЛ оцінювали за вмістом одного з кінцевих метаболітів реакції пероксидації – маленового діальдегіду (МДА) (Mannervik, 1971).

Цифрові показники, отримані в ході досліджень, обробляли методом варіаційної статистики. У таблицях і тексті наведено $M \pm m$. Вибіркі порівнювали з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

На фоні тривалого перебігу запального процесу, спричиненого інфекційними чинниками, в умовах неефектив-

ної терапії уrogenітальних інфекцій розвиваються глибокі порушення з боку морфофункціональних і біохімічних показників сперми, системи антиоксидантного захисту та неплідність (Vorobets and Kocheshkova, 2008).

Раніше показано, що хронічні запальні процеси чоловічих статевих органів мають характер багатогогнищевих уражень (Vorobets and Kocheshkova, 2008). Послідовне залучення до запального процесу передньої уретри та її залозистого апарату, задньої уретри, сім'яного горбика, вивідних протоків, а згодом і паренхіми передміхурової залози, сім'яних міхурців і додатків яєчок взагалі є типовим для висхідних інфекцій, що передаються статевим шляхом. Проведене нами групування локалізацій запальних уражень не вичерпує всієї їх індивідуальної різноманітності. Адже у групи хворих на простатит об'єднували пацієнтів із поверхневими, вогнищевими та дифузними процесами. Крім того, патологічні зміни в уретрі в ряді випадків виявляли лише у передньому та задньому її відділах; в інших діагностовано тотальний уретрит.

У таблиці 1 наведено характеристику пацієнтів з їх розподілом за етіологічним фактором розвитку хронічної уrogenітальної захворюваності. Хронічні запальні процеси чоловічих статевих органів найбільшою мірою спричинені хламідіями (22%), хламідіями та уреоплазмами (16%), хламідіями та трихомонадами (13%). Серед обстежених був великий відсоток пацієнтів зі скаргами на хронічний біль в області таза, коли інфекційний агент при комплексному обстеженні виявити все ж не вдалося, проте виявляли лейкоцити у секреті простати, порції сечі (після масажу простати) чи спермі.

Таблиця 1

Етіологічний чинник уrogenітальних захворювань

Етіологічний чинник	Кількість хворих	Відсоток
Хламідіоз	14	22
Хламідіоз + уреоплазмоз	11	16
Хламідіоз + трихомоніаз	9	13
Уреоплазмоз	7	10
Гонорея	4	6
Трихомоніаз	6	9
Гонорея + трихомоніаз	5	8
Хронічний абактеріальний простатит / хронічний тазовий больовий синдром	11	16

При хронічних запальних процесах у сечостатевих органах спостерігається зниження практично всіх показників функціональної активності сперматозоїдів (табл. 2). Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті знижується у 2,7 раза, а їх рухливість – у 1,8 раза. Кількість патологічних форм зростає в 1,7 раза.

При лікуванні хворих із хронічними специфічними уrogenітальними інфекціями ми дотримувались класичних принципів та підходів (Vorobets and Kocheshkova, 2008). Критеріями вилікування вважали зникнення клінічних симптомів захворювання та елімінацію збудника. Також ураховували наявність змін у спермограмі та динаміку змін у системі «пероксидне окиснення ліпідів – антиоксидантна система».

Зміни морфофункціональних характеристик еякуляту чоловіків з екскреторно-токсичною формою

неплідності після проведеного лікування відображені у таблиці 3. Застосування препаратів з антиоксидантними властивостями у хворих з екскреторно-токсичною формою неплідності переважно поліпшує рухливість і морфологію сперматозоїдів.

Таблиця 2

Морфофункціональні характеристики еякуляту чоловіків з олігозооспермією при уrogenітальних інфекціях

Показники еякулятів	Група 1, контроль (n = 20)	Група 2, екскреторно-токсична форма неплідності (n = 67)
Концентрація сперматозоїдів, 10 ⁶ мл ⁻¹	63 ± 3,5	24 ± 1,6
Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, 10 ⁶	145 ± 7,6	53 ± 3,2
Відносна кількість рухливих сперматозоїдів, %	62 ± 2,4	34 ± 3,5
Кількість патологічних форм, %	28 ± 2,0	49 ± 2,7
Концентрація лейкоцитів в еякуляті, 10 ⁹ л ⁻¹	0,73 ± 0,13	1,51 ± 0,46

Таблиця 3

Морфофункціональні характеристики еякуляту чоловіків груп 3 і 4 через 3 місяці після початку лікування

Показники еякулятів	Група 3 (після базисного лікування)	Група 4 (після базисної та антиоксидантної терапії)
Концентрація сперматозоїдів, 10 ⁶ мл ⁻¹	40 ± 2,5	39 ± 2,7
Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, 10 ⁶	64 ± 3,5	66 ± 3,4
Відносна кількість рухливих сперматозоїдів, %	41 ± 2,3	58 ± 2,1*
Кількість патологічних форм, %	40 ± 2,0	32 ± 1,6*
Концентрація лейкоцитів в еякуляті, 10 ⁹ л ⁻¹	0,78 ± 0,074	0,76 ± 0,086

Примітка: * – різниця між основною та контрольною групами вірогідна при P < 0,05.

Оскільки дані літератури свідчать, що функціональна активність сперматозоїдів тісно пов'язана з продукуванням активних форм кисню, зокрема з пероксидацією ліпідів, ми вивчали інтенсивність ПОЛ і активність ряду ензимів антиоксидантного захисту до і після курсу лікування. Інтенсивність ПОЛ у сперматозоїдах оцінювали за вмістом МДА. У практично здорових чоловіків (група 1) вміст МДА становив 182,6 ± 4,2 нмоль/мг протеїну, у групі 2 (без антиоксидантної терапії) цей показник був вищим – 237,2 ± 22,4 нмоль/мг протеїну. У групі 4 (пацієнтам проводили базисну та антиоксидантну терапію) концентрація МДА у сперматозоїдах становила 179,2 ± 16,2 нмоль/мг протеїну.

Лікування хворих протягом трьох місяців із призначенням лише базисної терапії зумовлювало зростання глутатіонпероксидазної активності з 2,9 до 3,8 мкмоль GSH/хв-мг протеїну. Поєднання базисної та антиоксидантної терапії викликало ще більше зростання активності ензиму, а значить, активацію антиоксидантного захисту.

Активність ензимів антиоксидантної системи сперматозоїдів чоловіків з екскреторно-токсичною формою неплідності в контролях і після проведених курсів лікування

Показники про-та антиоксидантної систем	Група 1 (контроль) (n = 9)	Група 2 (n = 9)	Група 3 (n = 9)	Група 4 (n = 9)
МДА, нмоль/мг протеїну	182,6 ± 4,2	235,0 ± 6,1	237,2 ± 22,4*	179,2 ± 16,2*
СОД, ум. од./г протеїну	8,8 ± 0,4	12,1 ± 0,9	10,8 ± 0,7	9,7 ± 0,6
ГП, мкмоль GSH/хв·мг протеїну	6,7 ± 0,5	2,9 ± 0,2	3,8 ± 0,3*	5,6 ± 0,4*
ГР, нмоль NADPH/хв·мг протеїну	0,55 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,36 ± 0,04*	0,46 ± 0,05*

Примітка: * – різниця між групами 3 і 4 вірогідна при $P < 0,05$.

Глутатіонредуктазна активність також відрізнялась: 0,32 нмоль NADPH/хв·мг протеїну у сперматозоїдах хворих групи 2, та 0,46 нмоль NADPH/хв·мг протеїну у сперматозоїдах хворих групи 4 по закінченні повного курсу базисного та антиоксидантного лікування.

На відміну від ГП і ГР активностей, супероксиддисмутазна активність сперматозоїдів у хворих з екскреторно-токсичною формою неплідності зростала з 8,8 до 12,1 ум. од./г протеїну. У результаті лікування (базисна + антиоксидантна терапія) ця активність знижувалась і наближалась до значень при нормозооспермії.

Із наведених даних можна прослідкувати взаємозв'язок між низькою біологічною якістю сперматозоїдів у хворих з екскреторно-токсичною формою неплідності (низька концентрація, загальна кількість і рухливість сперматозоїдів в еякуляті, збільшення кількості патологічних форм) з активацією процесів ПОЛ і пригніченням активності глутатіонової антиоксидантної системи. Щодо СОД негативного впливу АФК на цей фермент не спостерігалось. Підвищення активності СОД у сперматозоїдах при патоспермії можна пояснити компенсаторною реакцією на зростання інтенсивності вільнорадикального окиснення (Calmera et al., 2005; Kawakami and Takemura, 2007).

Лікування хворих основної групи (базисна + антиоксидантна терапія) викликає зниження процесів ПОЛ, активацію ферментів глутатіонової антиоксидантної системи. Це супроводжується зростанням якості сперми.

Наші результати узгоджуються з даними інших авторів, які демонструють значний захисний ефект антиоксидантів (зокрема вітаміну Е) на якість сперми та підтверджують доцільність їх використання при лікуванні чоловічої неплідності та зберіганні сперми (Yousef, 2010; Ben Abdallah et al., 2011; Jerysz and Lukaszewicz, 2013). Комбіноване призначення вітамінів Е та С викликає зниження продукції вільних радикалів і поліпшує якість сперми, хоча більшою ефективністю володіє вітамін Е (Yousef, 2010). Вважається, що вітамін Е захищає від пошкодження сперматозоїдів активними формами кисню (Sen et al., 2006; Yousef, 2010; Jerysz and Lukaszewicz, 2013). Так, при пероральному лікуванні антиоксидантами субфертильних чоловіків відмічалось значне зниження рівня АФК та збільшення концентрації сперматозоїдів, а також індукування акросомної реакції та зростання відсотка поліненасичених жирних кислот спермальних мембран (Jerysz and Lukaszewicz, 2013). Дослідження з використанням антиоксидантів *in vivo* та *in vitro* інколи суперечливі та вимагають подальших експериментів (Agarwal et al., 2008; Yousef, 2010; Jerysz and Lukaszewicz, 2013), тому нині проводиться подвійне

сліпе плацебо контрольоване дослідження ефективності використання комбінацій вітамінів Е та С при лікуванні чоловічої неплідності.

Висновки

Важливою причиною низької запліднювальної здатності сперматозоїдів є зниження концентрації та рухливості сперматозоїдів, порушення їх структури, що супроводжується підвищенням інтенсивності вільнорадикального окиснення – накопиченням МДА та зниженням активності ферментів глутатіонової антиоксидантної системи (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази).

Одним із факторів патогенезу хронічних запальних процесів чоловічих статевих органів як основної причини розвитку екскреторно-токсичної форми неплідності є підвищення активності пероксидного окиснення ліпідів мембран сперматозоїдів та декомпенсація ферментативної активності глутатіонової антиоксидантної системи.

Тримісячний курс прийому препаратів з антиоксидантними властивостями (вітаміну Е 600 мг/день, вітаміну С 500 мг/день) та цинку сульфату сприяє поліпшенню показників спермограми (в основному поліпшення рухливості та морфології сперматозоїдів), зменшенню кількості пероксидних сполук і активації глутатіонової антиоксидантної системи, що в цілому поліпшує функціональні властивості сперматозоїдів.

Бібліографічні посилання

- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Amer. J. Reprod. Immunol.* 59(1), 2–11.
- Aitken, R.J., Baker, M.A., 2013. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: Relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *J. Reprod. Immunol.* 100(1), 11–19.
- Aitken, R.J., Bennetts, L.E., 2007. Reactive oxygen species and their impact on fertility. *Male infertility. Diagn. Treatment.* 15(1), 255–268.
- Ben Abdallah, F., Fetoui, H., Zribi, N., Fakfakh, F., Ammar-Keskes, L., 2011. Antioxidant supplementations *in vitro* improve rat sperm parameters and enhance antioxidant enzyme activities against dimethoate-induced sperm damages. *Andrologia* 44(1), 272–279.
- Biswas, A., Mohan, J., Sastry, K., 2009. Effect of higher dietary vitamin E concentrations on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. *Br. Poult. Sci.* 50(6), 733–738.

- Calmera, J., Buffone, M., Ollero, M., 2005. Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenonormozoospermic, and polyzoospermic semen samples. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 422–430.
- Eliasson, R., 1971. Standart for investigation of human semen. *Andrologia* 2(10), 3–49.
- Jerysz, A., Lukaszewicz, E., 2013. Effect of dietary selenium and vitamin *E* on ganders' response to semen collection and ejaculate characteristics. *Biol. Trace Elem. Res.* 153(1–3), 196–204.
- Kawakami, E., Takemura, A., 2007. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic beagles. *J. Vet. Med. Sci.* 69(2), 133–136.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265–279.
- Luconi, M., Forti, G., Baldi, E., 2006. Pathophysiology of sperm motility. *Front Biosci.* 11, 1433–1447.
- Mannervik, B., 1971. Glutathione peroxidase. *Meth. in Enzym.* 77, 13–33.
- Sen, C.K., Khanna, S., Roy, S., 2006. Tocotrienols: Vitamin *E* beyond tocopherols. *Life Sci.* 78(18), 2088–2098.
- Vorobets, D.Z., Kocheshkova, N.S., 2008. Infertility and erectile dysfunction: Biochemical and clinical aspects. *Ukrmedknyga, Ternopil* (in Ukrainian).
- WHO laboratory manual for the examination of Human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd and 4th ed., 1992 and 1999. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Yousef, M.I., 2010. Vitamin *E* modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits. *Food. Chem. Toxicol.* 48(5), 1152–1159.

Надійшла до редколегії 18.10.2013