

Aktywność katalazy i stężenie żelaza w nasieniu ludzkim

Catalase activity and concentration iron in human semen

Aleksandra Kasperczyk, Stanisław Horak¹

STRESZCZENIE

Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii oraz
¹Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii,
Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej
w Bytomiu
Wydziału Lekarskiego
z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

WSTĘP

Aktywność enzymów wchodzących w skład układu antyoksydacyjnego nasienia może w miarę starzenia organizmu ulec osłabieniu, co może być przyczyną obniżenia zdolności zapładniającej nasienia. Celem pracy było ustalenie, czy wraz z wiekiem zmieniają się aktywność katalazy i stężenie żelaza w nasieniu ludzkim i jak zmiany te wpływają na jego jakość.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiło nasienie o prawidłowej morfologii pobrane od 63 mężczyzn w wieku od 28 do 37 lat (grupa I – do 33 roku życia; grupa II – powyżej 33 roku życia). Wykonano badanie morfologiczne nasienia, oznaczono aktywność katalazy i stężenie żelaza w plazmie nasiennej.

WYNIKI

Stwierdzono, że wraz z wiekiem obniża się liczba plemników ruchliwych, zwłaszcza o ruchu linearnym, natomiast zwiększa się stężenie żelaza. Wraz ze spadkiem objętości nasienia wzrasta aktywność katalazy i stężenie żelaza, zaś wzrostowi aktywności katalazy towarzyszy wzrost stężenia ruchliwych plemników. Wykazano ponadto dodatnią korelację pomiędzy aktywnością katalazy a stężeniem żelaza.

WNIOSKI

Katalaza wykazuje działanie ochronne na błonę komórkową plemników. Stężenie żelaza w plazmie nasienia wzrasta u mężczyzn wraz z wiekiem, co może przyczyniać się do uszkodzenia plemników.

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Aleksandra Kasperczyk
Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii
Wydziału Lekarskiego
z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Jordana 19
41-808 Zabrze
tel./fax 32 272 23 18
e-mail: akasperczyk@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 2, 112–116
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
ISSN 0208-5607

SŁOWA KLUCZOWE

katalaza, żelazo, nasienie

ABSTRACT

INTRODUCTION

The activity of antioxidant system enzymes in human semen might be age dependent, thus the quality of it may get worse. The aim of this study was to investigate the correlation between the age, catalase activity and iron concentration in seminal plasma and the influence of these factors on the quality of semen.

MATERIALS AND METHODS

Normospermic semen samples were obtained from 63 men (range, 22–37 years) and divided in two age groups: under 33 (group I) and over 33 years old (group II). The semen parameters, catalase activity and iron concentration were determined in seminal plasma.

RESULTS

We observed that in group II the iron concentration in seminal plasma increased but sperm motility (especially linear progressive motility) dropped with age. A lower semen volume showed a significant increase in catalase activity as well as iron concentration. Increasing catalase activity showed a significant positive relationship with better sperm quality. We found positive correlations between catalase activity and iron concentration.

CONCLUSION

Catalase has a protective effect on sperm cell membranes. Iron concentration in seminal plasma rises in an age dependent manner which may contribute to sperm cells damage.

KEY WORDS

catalase, iron, sperm

WSTĘP

Reaktywne formy tlenu (RFT) mają negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmu i często są brane pod uwagę podczas wyjaśniania patomechanizmu wielu chorób, m.in. nowotworów, chorób układu krążenia i chorób układu moczowo-płciowego. Niepłodność stanowi obecnie chorobę społeczną, na którą cierpi około 13–18% populacji ludzkiej, niezależnie od rasy oraz grup etnicznych [1,2]. Przyczyną niepłodności męskiej może być m.in. osłabienie procesu spermatogenezy, defekty w morfologii plemników oraz zmiany w fizjologii i właściwościach biochemicznych nasienia. Zmiany te mogą być uwarunkowane zaburzeniami molekularnymi i biochemicznymi zachodzącymi w plemnikach. Zwraca się również dużą uwagę na zaburzenia równowagi pomiędzy związkami wchodzącymi w skład układu prooksydacyjno-antyoksydacyjnego w nasieniu, co może powodować zmiany w metabolizmie komórek rozrodczych i może przyczyniać się do obniżenia płodności [3]. Procesy tlenowe w nasieniu ludzkim powodują powstawanie szkodliwych RFT, które działając na błony komórkowe plemników powodują ich defekty związane z utlenieniem zawartych w nich wielonienasyco-

nych kwasów tłuszczowych [4] i nagromadzenie w nasieniu dwualdehydu malonowego, który jest produktem reakcji utleniania.

Dla zapewnienia prawidłowej funkcji nasienia niezbędna jest równowaga między wytwarzaniem RFT a działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego, chroniącego plemniki przed uszkodzeniem. Układ antyoksydacyjny nasienia zawiera wiele składników, w tym związki enzymatyczne i nieenzymatyczne, znajdujące się zarówno w plazmie, jak i w plemnikach. Ich niedobór może osłabiać zdolność zapładniającą ejakulatu. W nasieniu wykazano m.in. aktywność dysmutazy nadtlencowej (*superoxide dismutase* – SOD), peroksydazy glutationowej (*glutathione peroxidase* – GPx), reduktazy, transferazy glutationowej (*glutathione reductase* – GR) i katalazy (*catalase* – CAT). Jednym z ważniejszych enzymów o działaniu antyoksydacyjnym jest SOD, w reakcji dysmutacji eliminujący ze środowiska anionorodniki nadtlencowe, z których powstaje nadtlenek wodoru (naturalny produkt metabolizmu komórkowego, toksyczny dla komórek ze względu na swoje właściwości utleniające), rozkładany następnie przez katalazę do wody i tlenu.

Katalaza jest tetramerem, złożonym z czterech podjednostek, każda o masie cząsteczkowej około 60 kDa

zawiera grupę hemową (m.in. żelazo) i miejsce wiązania dla fosforanu dwunukleotydu nikotynamidowo-adeninowego (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase* – NADPH). Jej powinowactwo do nadtlenu wodoru wzrasta dopiero przy wyższych stężeniach substratu, co może mieć miejsce podczas wybuchu oddechowego fagocytów lub przy nadekspresji SOD, uwalniającej duże ilości H_2O_2 [5]. Z tego też powodu sugeruje się jej wspólny z SOD udział w ochronie plemników przed toksycznym działaniem tlenu w czasie stanu zapalnego [6]. Wykazano, że źródłem katalazy w nasieniu jest głównie prostata, chociaż jej aktywności nie skorelowano z markerami tego narządu, takimi jak kwas cytrynowy czy cynk. Zlokalizowano ją zarówno wewnątrz plemników, jak i w plazmie nasiennej.

Dla prawidłowej aktywności katalazy niezbędne jest żelazo. Jednocześnie pierwiastek ten w stanie wolnym w plazmie nasiennej może podtrzymywać stres oksydacyjny [7]. Żelazo należy do metali przejściowych i dlatego nadtlenek wodoru łatwo wchodzi z nim w reakcję Fentona, w której produktem jest rodnik hydroksylowy (OH^\cdot) o bardzo silnych właściwościach utleniających.



Czynnikiem limitującym tę reakcję jest dostępność jonów żelazowych (Fe^{2+}). Są one regenerowane w wyniku reakcji redukcji przez anionorodnik ponadtlenkowy. Reduktorem mogą być również takie substancje, jak askorbinian, NADPH, zredukowany glutation, cysteina lub grupy tiolowe białek. W tej reakcji Fe^{2+} pełni rolę katalityczną, co sprawia, że zachodzi ona nawet przy ich bardzo małych stężeniach [5].

Celem pracy było wykazanie, czy z wiekiem zmienia się aktywność katalazy i stężenie żelaza w nasieniu ludzkim i jak zmiany te wpływają na jego jakość.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiło nasienie pobrane od 63 mężczyzn w wieku 28–37 lat, z małżeństw cierpiących na niepłodność, u których nie stwierdzono patologii nasienia. Badanych podzielono na dwie grupy, uwzględniając kryterium wieku określone na podstawie mediany wieku badanej populacji: I – do 33 roku życia ($n = 33$), II – 33 lata i więcej ($n = 30$).

Analiza nasienia

Nasienie pobrano po 3–7-dniowej abstynencji seksualnej do sterylnych pojemników i poddano je rutynowej analizie: zmierzono objętość, oznaczono stężenie plemników, ruchliwość (ze szczególnym uwzględnie-

niem ruchu progresywnego) oraz określono liczbę form prawidłowych plemników według aktualnych norm WHO [8]. Następnie nasienie odwirowano i supernatant zamrożono w temperaturze $-75^\circ C$ do czasu oznaczenia aktywności katalazy i stężenia żelaza.

Oznaczenie aktywności peroksydazowej katalazy

Katalazę oznaczono metodą spektrofotometryczną, opierając się na reakcji enzymu z metanolem i nadtlakiem wodoru. Powstający formaldehyd był oznaczony spektrofotometrycznie w reakcji z purpaldem przy długości fali 550 nm. Wartość przedstawiono w jednostkach U/l lub w przeliczeniu na gram białka [9].

Oznaczenie stężenia żelaza

Żelazo oznaczono w plazmie nasienia przy użyciu analizatora biochemicznego. Stężenie wyrażono w $\mu g/dl$.

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano arkusz kalkulacyjny Excel i program Statistica 8.0 PL. Wartości przedstawiono jako średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe (SD). Normalność rozkładu sprawdzono testem Shapiro-Wilka. Do analizy porównawczej między grupami wykorzystano test t dla prób niezależnych, test t z niezależną estymacją wariancji oraz test U Manna-Whitneya. Do oceny korelacji wykorzystano test Spearmana. Za znamienne statystycznie przyjęto zmiany przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Autorzy otrzymali zgodę Komisji Bioetycznej KNW/0022/KB1/I/13/09 na przeprowadzenie badań.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań zebrano w tabelach I–III.

W tabeli I przedstawiono parametry seminologiczne w badanej populacji. Z przeprowadzonej analizy statystycznej wynika, że wraz z wiekiem obniża się liczba plemników ruchliwych ($p = 0,027$). Ponadto wykazano, że w II grupie badanej zwiększa się stężenie żelaza ($p = 0,036$; tab. II). Korelacje pomiędzy badanymi parametrami seminologicznymi i biochemicznymi nasienia przedstawiono w tabeli III. Wykazano, że wraz ze związanym z wiekiem spadkiem objętości nasienia wzrastają aktywność katalazy i stężenie żelaza, przy czym wzrostowi aktywności katalazy towarzyszy wzrost liczby prawidłowych plemników. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy aktywnością katalazy a stężeniem żelaza.

KATALAZA I ŻELAZO W NASIENIU

Tabela I. Parametry seminologiczne w badanej populacji
Table I. Semen parameters in study population

Parametr	Wiek				p	Całość	
	do 33 lat		33 lata i więcej			n = 63	
	n = 33	n = 30	n = 30	n = 30		średnia	SD
Wiek (lata)	28,8	2,83	37,7	4,36	< 0,001	33,0	5,73
Objętość (ml)	3,77	1,38	3,27	2,26	0,301	3,53	1,85
Stężenie plemników (mln/ml)	71,3	59,6	98,8	64,0	0,084	84,4	62,8
Liczba plemników (mln)	260	205	286	191	0,605	272	197
% prawidłowych	53,1	8,38	50,4	7,49	0,179	51,8	8,03
% ruchliwych	63,8	8,87	59,2	7,34	0,027	61,6	8,45
% o ruchliwości linearniej	29,5	11,12	28,1	11,34	0,634	28,8	11,16

Tabela II. Aktywność katalazy, stężenie białka i żelaza w plazmie nasienia
Table II. Catalase activity, protein and iron concentration in seminal plasma

Plazma nasienia	Wiek				p	Całość	
	do 33 lat		33 lata i więcej			n = 63	
	n = 33	n = 30	n = 30	n = 30		średnia	SD
Aktywność CAT-Px (U/l)	687	560	713	454	0,853	699	508
Aktywność CAT-Px (U/g białka)	18,0	19,5	19,6	17,0	0,747	18,7	18,2
Stężenie białka g/l	44,4	12,5	41,4	11,6	0,369	43,0	12,1
Stężenie żelaza µg/dl	2,72	2,07	3,89	1,98	0,036	3,24	2,09

Tabela III. Korelacje pomiędzy parametrami seminologicznymi i biochemicznymi badanych ejakulatów (wartość R współczynnika korelacji, ***p < 0,001 **p < 0,01 *p < 0,05)
Table III. Correlation between seminological and biochemical parameters of investigated ejaculates (value R correlation ratio, ***p < 0,001 **p < 0,01 *p < 0,05)

Parametr	Stężenie białka	Aktywność CAT-Px (U/l)	Aktywność CAT-Px (U/g białka)	Żelazo
Wiek (w latach)	NS	NS	NS	NS
Objętość (ml)	NS	- 0,28*	NS	- 0,31*
Stężenie plemników (mln/ml)	NS	NS	NS	NS
Liczba plemników (mln)	NS	NS	NS	NS
% prawidłowych	- 0,29*	NS	0,25*	NS
% ruchliwych	NS	NS	NS	NS
% o ruchliwości linearniej	NS	NS	NS	NS
Aktywność CAT-Px (U/l)	- 0,42**		0,89***	0,44*
Aktywność CAT-Px (U/g białka)	- 0,77***			0,41*
Stężenie żelaza	NS			

DYSKUSJA

Oslabienie parametrów nasienia, takich jak ruchliwość, stężenie i liczba plemników czy liczba form prawidłowych, wpływa niekorzystnie na płodność. Obecnie coraz częściej zwraca się uwagę na stres oksydacyjny upośledzający zdolność zapładniającą nasienia. Podkreśla się, że zachwianie równowagi

między produkcją a degradacją RFT może wywołać stres oksydacyjny w nasieniu i uszkodzenia błon komórkowych plemników (proces peroksydacji lipidów), co w konsekwencji osłabia ich jakość, np. ruchliwość [10].

W niniejszej pracy wykazano, że stężenie żelaza w plazmie nasienia jest u mężczyzn po 33 roku życia wyższe niż do 33 roku życia. Pierwiastek ten w plazmie nasiennej występuje w stanie wolnym, ponadto jest związany z katalazą i innymi białkami plazmy

nasienia, w tym z transferryną z komórek Sertolego i laktoferryną. Wykazano, że transferryna wpływa pozytywnie na ruchliwość plemników [11], a laktoferryna działa bakteriostatyczne. Być może z wiekiem postępuje degradacja wymienionych białek, co może zwiększać pulę wolnego żelaza w plazmie nasiennej. W tej formie żelazo może podtrzymywać stres oksydacyjny.

Udowodniono, że proces peroksydacji błonowych fosfolipidów w męskich komórkach rozrodczych jest inicjowany przez promocyjne działanie jonów metali przejściowych, w tym Fe^{2+} (reakcja Fentona). Powszechnie uważa się go za podstawowy mechanizm indukowanego przez RFT uszkodzenia tych komórek [5]. Może się to przejawiać wzrostem nieswoistej przepuszczalności błon plemników wskutek modyfikacji lipidów należących do struktury tych organelli. Efektem jest obniżenie ruchliwości i przeżywalność gamet męskich, głównie z powodu utraty ATP [12,13] i zmiany w ich morfologii [14], co w konsekwencji wpływa negatywnie na zdolność zapładniającą plemników [15,16].

Cummins i wsp. [17] również stwierdzili związek nadmiernej generacji wolnych rodników w nasieniu z potencjalnym osłabieniem zdolności reprodukcyjnej przez zaburzenie metabolizmu i morfologii nasienia. Ze względu na dużą wrażliwość męskich komórek rozrodczych nasienie zawiera wiele enzymów i związków nieenzymatycznych, neutralizujących nadmiar RFT, znajdujących się zarówno w plazmie nasiennej, jak i wewnątrz plemników [5]. Do enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego należy m.in. katalaza zawierająca grupę hemową. Jest to enzym ochraniający komórki żywych organizmów przed

skutkami toksycznego działania H_2O_2 , mający dwie funkcje katalityczne zależne od stężenia H_2O_2 w środowisku.

Nadtlenek wodoru powstaje w procesach fizjologicznych wewnątrz komórek plemnikowych, m.in. w procesie nabywania zdolności do zapłodnienia. Dochodzi wtedy do kapacytacji i hiperaktywacji plemników, co wiąże się z metabolizmem tlenowym, a następnie z procesami oksydacyjnymi, w których wytwarzane są O_2^- i H_2O_2 . Proces kapacytacji indukowano również *in vitro* małymi stężeniami H_2O_2 w plemnikach chomiczych [18] i ludzkich [19]. W procesie tym następują molekularne odwracalne zmiany w błonie komórkowej plemników (np. usunięcie grup cholesterolowych, zwiększenie stosunku nienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyconych oraz modyfikacje białek), co zmniejsza jej stabilność. Jeulin i wsp. oraz Sciliano i wsp. wykazali znaczny spadek aktywności katalazy u niepłodnych pacjentów z zaburzeniami ruchu plemników [20,21].

W przedstawionej pracy wykazano, że wraz ze wzrostem aktywności katalazy rośnie odsetek prawidłowych plemników, co może potwierdzać ochronne działanie tego enzymu na ich błonę komórkową.

WNIOSKI

1. Katalaza działa ochronnie na błonę komórkową plemników.
2. Stężenie żelaza w plazmie nasienia rośnie u mężczyzn po 33 roku życia, co może przyczyniać się do indukowania uszkodzenia plemników.

PIŚMIENNICTWO

1. Hull M., Glazener C., Kelley N. i wsp. Population study of causes, treatment and outcome of fertility. *Br. Med. J.* 1985; 291: 1693–1697.
2. Irvine D.S. Epidemiology and etiology of male infertility. *Hum. Reprod.* 1998; 13 suppl. 1: 33–44.
3. Shiva M., Gautam A., Verma Y., Shivgotra V., Doshi H., Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin. Biochem.* 2011; 44: 319–324.
4. Storey B. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 203–213.
5. Frączek M., Kurpisz M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2005; 59: 523–534.
6. Baker H., Brindle J., Irvine D., Aitken R. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil. Steril.* 1996; 65: 411–419.
7. Kwenang A., Kroos M., Koster J., Eijk H. Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Hum. Reprod.* 1987; 2: 387–388.
8. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen. V ed. Cambridge University Press 2010.
9. Johansson L., Borg L. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 1988; 174: 331–336.
10. Sharma R., Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835–850.
11. Bharshankar R.N., Bharshankar J.R. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 2000; 44: 456–460.
12. Alvarez J., Touchstone J., Blasco L., Storey B. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 1987; 8: 338–348.
13. Kobayashi T., Miyazaki T., Natori M., Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1991; 6: 987–991.
14. Rao B., Soufi J., Martin M., David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 1989; 24: 127–134.
15. Aitken R., Harkiss D., Buckingham D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 98: 257–265.
16. Aitken R., Irvine D., Wu F. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 164: 542–551.
17. Cummins J., Jequier A., Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Mol. Reprod. Dev.* 1994; 37: 345–362.
18. Bize I., Santander G., Cabello P., Driscoll D., Sharpe C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1991; 44: 398–403.
19. Griveau J., Renard P., Le Lannou D. An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int. J. Androl.* 1994; 17: 300–307.
20. Jeulin C., Soufir J.C., Weber P., Laval-Martin D., Calvayrac R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 1989; 24: 185–196.
21. Sciliano L., Tarantino P., Longobardi F., Rago V., De Stefano C., Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J. Androl.* 2001; 22: 798–803.