

Rola wapnia w nasieniu ludzkim i jego związek z układem antyoksydacyjnym

The role of calcium in human sperm in relation to the antioxidant system

Aleksandra Kasperczyk^{1(a, b, c)}, Michał Dobrakowski^{1(a, c)}, Jolanta Zalejska-Fiolka^{1(c)},
Stanisław Horak^{2(b, c)}, Anna Machoń^{1(d)}, Ewa Birkner^{1(c)}

¹ Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii w Zabrze. Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. med. E. Birkner

² Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze
Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Położnictwa i Ginekologii Onkologicznej w Bytomiu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. A. Olejek

(a) opracowanie koncepcji i założeń

(b) zebranie materiału

(c) opracowanie tekstu

(d) piśmiennictwo

STRESZCZENIE

Wstęp. Ludzki ejakulat składa się z plemników i plazmy nasiennej w skład której wchodzi związek organiczne i nieorganiczne w tym biopierwiastki. Wapń jest niezbędny w procesie hiperaktywacji i kapacytacji komórki plemnikowej. Oba te procesy powodują wytwarzanie reaktywnych form tlenu czego efektem jest indukcja systemu antyoksydacyjnego. **Materiał i metody.** Materiał badany stanowiło nasienie pobrane od 61 mężczyzn u których średnia wieku wynosiła 33 lata, u których nie stwierdzono patologii nasienia. Badaną populację podzielono na dwie grupy o niskiej i wysokiej zawartości wapnia w plazmie nasienia. W badanym materiale oznaczono parametry seminologiczne, dysmutazę nadadtlenkową, katalazę, reduktazę glutationową, grupy sulfhydrylowe, dialdehyd malonowy, lipofuscynę, bilirubinę, kwas moczowy, albuminę oraz całkowitą zdolność oksydacyjną. **Wyniki.** U osób o wysokim poziomie wapnia w plazmie nasiennej (średnia 38,3 mg/dl) stwierdzono istotnie statystycznie wyższy odsetek plemników o ruchu postępowym nieliniarnym, wyższą aktywność izoenzymu manganowego dysmutazy nadadtlenkowej, reduktazy glutationowej, stężenie witamin A i E, bilirubiny i albumin w porównaniu z osobami o niskim poziomie wapnia (średnia 22,0 mg/dl). Ruchliwość plemników, aktywność tych enzymów oraz stężenie wymienionych antyoksydantów dodatnio korelowało ($p < 0,05$) z poziomem wapnia ($R = 0,26-0,64$). Niższe wartości stężeń lipofuscyny obserwowano w grupie z wysokim poziomem wapnia oraz ujemną korelację między Ca^{2+} a lipofuscyną ($R = -0,36$, $p < 0,05$). **Wnioski.** W niniejszej pracy wykazano korzyst-

ny wpływ wapnia na ruchliwość plemników w fizjologicznym nasieniu oraz stymulację układu antyoksydacyjnego pod wpływem wysokiego stężenia tego pierwiastka w plazmie nasienia u mężczyzn z prawidłowym spermogramem.

Słowa kluczowe: plazma nasienia, wapń, układ antyoksydacyjny, reaktywne formy tlenu

SUMMARY

Background. The human ejaculate consists of sperm and seminal plasma consisting of organic and inorganic compounds including micronutrients. Calcium is essential in the process of cell hyperactivation and sperm capacitation. Both these processes result in the generation of reactive oxygen species resulting in the induction of antioxidant system. **Material and Methods.** Semen samples were collected from 61 men of an average age of 33 years with no sperm pathology. The study population was divided into two groups with low and high concentrations of calcium in the seminal plasma. Analysis of the collected samples included: sperm morphology, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, sulphhydryl groups, malonaldehyde, lipofuscin, vitamin A and E, bilirubin, uric acid, albumin, and total oxidant status. **Results.** In individuals with high level of calcium in the seminal plasma (mean 38.3 mg/dl) were found significant increased nonlinear motility, higher activity of manganese isoenzyme superoxide dismutase, glutathione reductase, concentration of vitamin A and E, bilirubin and albumin in comparison with individuals with lower level of calcium

(mean 22.0 mg/dl). Nonlinear motility, the activity of enzymes, and concentration of antioxidants, as mentioned above, positively correlated ($p < 0,05$) with calcium level ($R = 0.26-0.64$). Lower concentration of lipofuscin was observed in group with high level of calcium and negative correlation between Ca^{2+} and lipofuscin ($R = -0.36$, $p < 0.05$). **Conclusions.** The present study showed calcium

beneficial effect on motility of spermatozoa in physiological semen and stimulation of antioxidant systems by high concentrations of this element in sperm plasma in men with normal spermiogram.

Key words: semen plasma, calcium, antioxidant system, reactive oxygen species

WSTĘP

Ludzki ejakulat składa się z plemników i plazmy nasiennej, która umożliwia transport i zapewnia prawidłowy metabolizm komórek plemnikowych. Plazma nasienia składa się z wydzielin pochodzących z jądra, najądrza oraz dodatkowych gruczołów płciowych zapewniającą prawidłowy rozwój i ruchliwość plemników [1].

Obok karnityny, aminokwasów, fruktozy i innych związków organicznych istotną rolę odgrywają jony metali oraz niektórych biopierwiastków takich jak: potas, sód, cynk, magnez miedź, wapń i żelazo [2]. Ludzkie nasienie zawiera wysoki poziom wapnia, magnezu, cynku i miedzi, które mogą występować w postaci związanej jak i formach jonowych. Ponadto w nasieniu mogą się pojawić pierwiastki i metale ciężkie m.in. kadm, ołów pochodzące ze środowiska zewnętrznego, co szczególnie ma znaczenie w przypadku osób zawodowo narażonych na powyższe związki i przebywających na terenach przemysłowych [3]. Nieprawidłowy poziom wapnia i magnezu oraz innych pierwiastków śladowych w szczególności cynku i miedzi może przyczynić się do zachwiania procesu spermatogenezy czego konsekwencją mogą być zaburzenia ruchliwości i spadek ilości plemników w ejakulacie [4, 5].

Wapń jest kluczowym regulatorem wielu fizjologicznych procesów zachodzących w każdej żywej komórce w tym również komórek plemnikowych. Jony wapnia (Ca^{2+}) pochodzą z prostaty, pęcherzyków nasiennych i najądrzy i są odpowiedzialne za wyzwolenie reakcji akrosomalnej zachodzącej w plemnikach. Ponadto wykazano, że poziom wapnia ma istotny wpływ na ruchliwość plemników [4]. Odpowiedzialny jest również za skład lipidów i kwasów tłuszczowych w osoczu nasienia jak i w samej komórce plemnikowej. Podczas procesu kapacytacji komórka plemnikowa ulega modyfikacjom molekularnym, metabolicznym, następuje również zmiana w topografii lipidów czemu towarzyszy wzrost poziomu jonów Ca^{2+} [6]. Wykazano, że wysoki poziom Ca^{2+} pochodzącego ze środowiska zewnętrznego może zmniejszać ruchliwość i metabo-

lizm plemników, niemniej jednak pierwiastek ten jest niezbędny w procesie hiperaktywacji plemnika czemu towarzyszy wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} [7].

Procesy tlenowe, które mają miejsce w nasieniu ludzkim powodują powstawanie szkodliwych reaktywnych form tlenowych (RFT), które działając na błony komórkowe plemników powodują ich defekty związane z utlenieniem zawartych w nich wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [8]. W wyniku tych procesów powstają utlenione pochodne lipidów: sprzężone dieny, nadtlenki lipidowe, dialdehyd malonowy (MDA) i 4-hydroksynonenal. Nasilenie procesów wolnorodnikowych można oznaczać poprzez ocenę stężenia poszczególnych produktów lub poprzez oznaczenie sumy tych produktów określanych jako TOS, czyli całkowitą zdolność oksydacyjną. Do innych wskaźników zalicza się lipofuscinę (LF) powstającą z oksydacyjnie zmodyfikowanych białek i produktów degradacji lipidów [9]. Dla zapewnienia prawidłowej funkcji nasienia niezbędna jest równowaga pomiędzy wytwarzaniem RFT a działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego, chroniącego plemniki przed uszkodzeniem. Układ antyoksydacyjny nasienia zawiera wiele składników, wśród których są związki enzymatyczne i nieenzymatyczne znajdujące się zarówno w plazmie jak i w plemnikach. Ich niedobór może osłabiać zdolność zapładniającą ejakulatu. Podstawowy enzymatyczny system antyoksydacyjny w ejakulacie obejmuje takie enzymy jak: dysmutaza nadtlenkowej (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza (GR) i katalaza (CAT) [10]. Ten system dodatkowo wspomagany jest przez tzw. nieenzymatyczne antyoksydanty do których można zaliczyć kwas moczowy, albuminę, bilirubinę witaminy A i E.

Celem niniejszej pracy jest wykazanie:

- czy poziom wapnia w plazmie nasienia może mieć wpływ na morfologię plemników,
- czy istnieje zależność pomiędzy poziomem wapnia a parametrami układu antyoksydacyjnego i stresem oksydacyjnym w prawidłowym nasieniu.

Praca posiada zgodę Komisji Bioetycznej KNW/0022/KB1/I/13/09.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiło nie patologiczne nasienie pobrane od 61 mężczyzn mieszkańców Górnego Śląska, u których średnia wieku wynosiła 33 lata. Poniższe badania wykonano w latach 2010–2013.

Badaną populację podzielono na dwie grupy o niskiej i wysokiej zawartości wapnia w plazmie nasienia, a jako kryterium podziału przyjęto medianę poziomu tego pierwiastka (wartość 30,0 mg/dl).

Analiza nasienia

Nasienie pobrano po 3–7-dniowej abstinencji seksualnej do sterylnych pojemników i poddano je rutynowej analizie: zmierzono objętość, oznaczono stężenie plemników, ruchliwość ze szczególnym uwzględnieniem ruchu progresywnego oraz określono ilość form prawidłowych plemników wg aktualnych norm WHO [11]. Następnie nasienie odwirowano i supernatant zamrożono w temperaturze -75°C do czasu oznaczenia badanych parametrów.

Oznaczenie poziomu wapnia

Wapń oznaczono w plazmie nasienia przy użyciu analizatora biochemicznego wykorzystując metodę kolorymetryczną, która jest oparta na reakcji z o-kreozoftaleiną w środowisku zasadowym. Poziom wyrażono w mg/dl.

Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność enzymu oznaczono wg Oyanagui [12]. Anionorodnik ponadtlenkowy wytwarzany przy udziale oksydazy ksantynowej reaguje z hydroksylaminą wytwarzając jon nitrozowy, który po połączeniu z naftylenodiaminą i kwasem sulfoanilinowym daje barwne połączenie. Odczyt dokonano przy długości fali 550 nm z wykorzystaniem spektrofotometru firmy Shimadzu UV-1700. Aktywność enzymatyczną wyrażono w jednostkach nitrowych (NU). Do oznaczenia aktywności izoenzymu CuZnSOD wykorzystano różnicę między aktywności całkowitą a pozostałą po zahamowaniu przez cyjanek potasu.

Oznaczenie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)

Stężenie MDA oznaczano w plazmie nasienia wykorzystując jego reakcję z kwasem tiobarbiturowym wg Ohkawy [13]. Do odczytu wykorzystano spektrofлуorymetr LS45 firmy Perkin Elmer przy długości fali 515 nm (absorbancja) i 522 nm (emisja). Stężenie

MDA odczytano z krzywej standardowej stosując jako standard 1,1,3,3-tetraetoksypropan i wyrażono w $\mu\text{mol/l}$.

Oznaczenie aktywności peroksydazowej katalazy (CAT)

Katalazę oznaczono metodą spektrofotometryczną w oparciu o reakcję enzymu z metanolem i nadtlenkiem wodoru. Powstający formaldehyd był oznaczany spektrofotometrycznie w reakcji z purpaldem przy długości fali 550 nm. Wartość przedstawiono w jednostkach U/l lub w przeliczeniu na gram białka [14].

Oznaczenie stężenia grup sulfhydrylowych (-SH)

Stężenie grup sulfhydrylowych (-SH) oznaczono wg Kostera (15), używając kwas 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoesowy) – DTNB, który ulega redukcji przez związki zawierające grupy sulfhydrylowe, dając pochodną anionową 5-tio-2-nitrobenzoesową o żółtym zabarwieniu. Pomiaru dokonano przy długości fali 412 nm. Stężenia przedstawiono w $\mu\text{mol/g}$ białka i w $\mu\text{mol/l}$.

Oznaczenie aktywności reduktazy glutationowej (GR)

Aktywność GR w oznaczono wg Richtericha [16]. Metoda ta oparta jest na oznaczeniu zmian stężenia zredukowanego NADPH, który ulega reakcji z utlenionym glutationem. Odczytano absorbancję przy długości fali 340 nm i śledzono kinetykę zmian absorbancji co 15 sekund przez 3 minuty z wykorzystaniem spektrofotometru firmy Shimadzu UV-1700. Aktywność przedstawiono jako liczbę μmol zużytego NADPH w ciągu minuty w U/l.

Oznaczenie całkowitej zdolności oksydacyjnej osocza TOS (total oxidant status)

Stężenie TOC oznaczono wg Erel [17] metodą spektrofotometryczną przy wykorzystaniu reakcji utleniania jonów żelaza przez związki utleniające w obecności oranżu ksylenowego.

Oznaczenie stężenia lipofuscyny (LPS)

W plazmie nasienia oznaczono stężenie LPS wg metody Jain [18]. Fluorescencję mierzono w klarownym supernatancie za pomocą spektrofлуorymetru LS45 firmy Perkin Elmer przy długości fali 360 nm (absorbancja) i 440 nm (emisja).

Wartości przedstawiono w jednostkach względnych (relative lipid extract fluorescence, RF), gdzie wartość 100 RF odpowiada fluorescencji roztworu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ siarczanu chinidyny w 0,1 N kwasie siarkowym.

Oznaczenie kwasu moczowego, bilirubiny, albuminy

Powyższe parametry oznaczono w plazmie nasienia metodami kolorymetrycznymi przy wykorzystaniu analizatora biochemicznego. Dla kwasu moczowego i bilirubiny stężenia podano w mg/dl natomiast albuminę wyrażono w g/ml.

Oznaczenie witaminy A i E

Stężenie witaminy A i E w plazmie nasienia oznaczono wg Shearera [19] z zastosowaniem wysokociśnieniowego chromatografu cieczowego (HPLC) firmy Knauer, sprzężonego z detektorem UV/VIS. Obróbki danych dokonano w pro-

gramie EUROCHROM 2000. Stężenia podano w µg/ml.

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano arkusz kalkulacyjny Excel i program Statistica 10.0 PL. Wartości przedstawiono jako średnia arytmetyczna 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 $p < 0,05$.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Tabela I. Parametry seminologiczne i poziom wapnia w badanej populacji

Table I. Semen parameters and calcium level

	Niski poziom wapnia n = 31		Wysoki poziom wapnia n = 31		Wartość p	% zmian
	średnia	SD	średnia	SD		
Wiek	33,2	6,24	31,6	5,25	0,277	-5%
Objętość	4,24	2,25	3,93	1,15	0,505	-7%
pH	7,57	0,07	7,56	0,07	0,662	-0,1%
Stężenie plemników (mln/ml)	75,4	56,2	69,8	50,2	0,683	-7%
Ilość plemników (mln) stęż./obj	298	217	254	158	0,374	-15%
% ruchomych plemników po 1 godz.	57,3	8,55	58,6	11,81	0,621	2%
% ruchomych plemników – ruch postępowy linearny szybki po 1 godz.	26,7	8,5	24,8	8,25	0,394	-7%
% ruchomych plemników – ruch postępowy linearny wolny po 1 godz.	16,7	5,54	19,6	8,28	0,109	18%
% ruchomych plemników – ruch postępowy nielinearny po 1 godz.	5,61	3,53	8,10	3,58	0,003	44%
% ruchomych plemników – ruch niepostępowy po 1 godz. (NP)	9,77	7,13	14,7	15,9	0,124	50%
% ruchomych plemników – ruch postępowy progresywny (PR) po 1 godz.	43,4	8,8	44,4	11,2	0,676	2%
% ruchomych plemników po 24 godz.	19,4	14,9	18,8	17,9	0,891	-3%
% ruchomych plemników – ruch linearny po 24 godz.	6,75	7,93	6,55	9,02	0,928	-3%
% prawidłowych plemników	50,8	8,16	53,6	7,92	0,175	6%
Stężenie wapnia (mg/dl)	22,0	6,31	38,3	7,9	<0,001	74%

W tabeli I przedstawiono wyniki badania seminologicznego i poziom wapnia w plazmie nasiennej w badanej populacji. W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano, że u osób o wysokim poziomie wapnia w plazmie nasiennej (średnia 38,3 mg/dl) wzrasta istotnie statystycznie o 44%

($p = 0,003$) odsetek plemników o ruchu postępowym nielinearnym w porównaniu do grupy o niskim poziomie wapnia (średnia 22,0 mg/dl). Ruchliwość ta dodatkowo korelowała z poziomem wapnia ($R = 0,41$, $p < 0,05$).

Tabela II. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, reduktazy glutationowej oraz stężenie grup SH w plazmie nasienia
Table II. Superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase activity and SH groups concentration in seminal plasma

	Niski poziom wapnia n=31		Wysoki poziom wapnia n=31		Wartość p	% zmian
	średnia	SD	średnia	SD		
aktywność SOD (NU/ml)	170	44,0	179	53,4	0,508	5%
aktywność Mn-SOD (NU/ml)	19,9	11,5	32,7	21,7	0,013	65%
aktywność CuZn-SOD (NU/ml)	146	40,4	141	44,3	0,740	-3%
stężenie grup SH (umol/l)	212	91,9	203	95	0,756	-4%
aktywność CAT-Px (U/l)	614	557	514	330	0,497	-16%
aktywność GR (U/l)	29,7	28,1	93,1	83,5	<0,001	213%

W tabeli II przedstawiono wyniki parametrów enzymatycznego układu antyoksydacyjnego oznaczonego w plazmie nasiennej w ni niejszej pracy. Wykazano, że u osób o wysokim poziomie Ca^{2+} w nasieniu wzrasta o 65% istotnie statystycznie ($p=0,013$) aktywność dysmutazy ponadtlenkowej

izoenzymu manganowego i reduktazy glutationowej o 213% ($p<0,001$) w porównaniu do grupy o niskim stężeniu Ca^{2+} . Aktywność tych enzymów dodatnio korelowała z poziomem wapnia ($R=0,38$, $p<0,05$ dla Mn-SOD i $R=0,31$, $p<0,05$ dla GR).

Tabela III. Wskaźniki stresu oksydacyjnego

Table III. Ratios of oxidative stress

	Niski poziom wapnia n=31		Wysoki poziom wapnia n=31		Wartość p	% zmian
	średnia	SD	średnia	SD		
SD TOS (umol/l)	7,89	11,36	10,1	12,5	0,598	28%
stężenie MDA (umol/l)	2,43	0,94	2,18	0,74	0,275	-10%
stężenie lipofuscyny (RF)	4,20	1,34	3,46	1,16	0,025	-18%

W tabeli III ujęto wskaźniki stresu oksydacyjnego. Wykazano znamienne spadek ($p=0,025$) lipofuscyny w grupie o wysokim poziomie wapnia w porównaniu do grupy o niskim poziomie Ca^{2+}

w plazmie nasienia. Korelowała ona ujemnie z wapniem ($R=-0,36$, $p<0,05$). Pozostałe parametry czyli TOS i MDA nie różniły się w badanych grupach.

Tabela IV. Parametry układu antyoksydacyjnego nieenzymatycznego w badanej populacji

Table IV. Non-enzymatic antioxidant system parameters

	Niski poziom wapnia n=31		Wysoki poziom wapnia n=31		Wartość p	% zmian
	średnia	SD	średnia	SD		
stężenie witaminy A (ug/ml)	0,04	0,02	0,06	0,04	0,027	55%
stężenie witaminy E (ug/ml)	6,88	2,83	9,70	3,34	0,009	41%
stężenie kwasu moczowego (mg/dl)	4,66	1,61	4,02	1,08	0,076	-14%
stężenie bilirubiny (mg/dl)	0,06	0,03	0,14	0,12	0,002	112%
stężenie albuminy (g/dl)	0,40	0,12	0,58	0,14	<0,001	44%

W tabeli IV zamieszczono wyniki nieenzymatycznego układu antyoksydacyjnego. Wykazano znamienne wyższe stężenia witaminy A ($p=0,027$) i E ($p=0,009$), bilirubiny (0,002) i albumin ($p<0,001$) w grupie o wysokim poziomie wapnia w porówna-

niu do grupy o niskim poziomie tego pierwiastka. Ponadto stężenie witaminy E, albuminy i bilirubiny dodatnio korelowało z poziomem wapnia ($R=0,47$, $p<0,05$ dla wit. E, $R=0,64$, $p<0,05$ dla albuminy i $R=0,26$, $p<0,05$ dla bilirubiny).

DYSKUSJA

Oslabienie parametrów nasienia takich jak ruchliwość, stężenie i liczba plemników, czy też 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 pomiędzy produkcją a degradacją reaktywnych form tlenu (RFT) może wywoływać stres oksydacyjny w nasieniu i powodować uszkodzenia błon komórkowych plemników (proces peroksydacji lipidów), co w konsekwencji osłabia ich jakość np. ruchliwość [20]. Plemniki aby uzyskać zdolność do zapłodnienia muszą przejść wiele procesów takich jak hiperaktywacja i kapacytacja, co jest związane z procesami oksydacyjnymi a tym samym ze wzrostem RFT w nasieniu. Tym przemianom towarzyszy wzrost poziomu Ca^{2+} i cAMP we wnętrzu komórki. Z kolei cAMP w plemniku nastawia przemianę węglowodanową na zwiększone wytwarzanie ATP w komórce w celu zwiększenia ruchliwości plemników [10].

W niniejszej pracy wykazano istotnie statystyczny wzrost odsetka plemników o ruchu postępowym nieliniarnym po 1 godzinie w grupie mężczyzn o wysokim poziomie wapnia w porównaniu do grupy o niskim poziomie tego pierwiastka. Towarzyszyła temu istotnie zwiększona aktywność dysmutazy ponadtlenkowej izoenzymu manganowego (Mn-SOD), reduktazy glutationowej (GR) oraz nieenzymatycznych antyoksydantów takich jak: bilirubina, witamina E oraz albumina. Prawdopodobnie u mężczyzn z wysokim poziomem wapnia miał miejsce wzmożony proces hiperaktywacji i kapacytacji plemników czemu towarzyszyło nadmierne wytwarzanie RFT, m.in. nadtlenu wodoru. Prawdopodobnie w wyniku nadmiernego stężenia H_2O_2 uaktywnił się układ obronny w postaci Mn-SOD, GR wspomagany przez antyoksydanty nieenzymatyczne. Nadtlenek wodoru z kolei aktywując cyklazę adenylową do wytwarzania cAMP prowadzi do wzrostu poziomu Ca^{2+} wewnątrz plemników [21]. Wyniki badań na temat wpływu wapnia na parametry nasienia są niejasne. W swojej pracy Prien i wsp. wykazali, że wraz ze zmniejszeniem ilości wapnia w nasieniu dochodziło do zaburzeń ruchliwości plemników, podczas gdy całkowita ilość wapnia nie różniła się w porównaniu do mężczyzn z normalną ruchliwością komórek plemnikowych [22]. Takie rozbieżności wynikają prawdopodobnie z formy wapnia w jakiej on występuje, czy w formie całkowitej czy też z niezjonizowanej [23].

Dowodzono, że RFT indukują proces kapacytacji i reakcji akrosomalnej pośrednio regulując poziom wapnia poprzez wzrost pH w komórce, prawdopodobnie uczestnicząc w aktywacji wymiennika Na^+/H^+ w błonie cytoplazmatycznej. Przypuszczalnie rodnik tlenowy ($\text{O}_2\cdot^-$) bierze również udział w inaktywacji pompy ATP-Ca^{2+} , zwiększając przepuszczalność błony komórkowej dla wapnia [10].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazują korzystny wpływ wysokiego poziomu wapnia w plazmie nasienia na ruchliwość plemników oraz stymulację układu antyoksydacyjnego (nieenzymatycznego i enzymatycznego) u mężczyzn z prawidłowymi parametrami nasienia. Jednocześnie wskaźniki stresu oksydacyjnego takie jak TOS czy MDA nie różniły się w badanych grupach. Prawdopodobnie jest to efekt nienasilonego stresu oksydacyjnego w komórkach plemnikowych mimo iż zachodziły w nich procesy fizjologiczne związane z wytwarzaniem RFT. Wzrost aktywności Mn-SOD, GR, witaminy A i E, bilirubiny oraz albuminy w badanym fizjologicznym nasieniu w grupie o wysokim poziomie wapnia spowodował niską syntezę produktów zmodyfikowanych białek i degradacji lipidów. U osób ze zwiększonym poziomem wapnia wykazano spadek stężenia lipofuscyny, co wskazywałoby na korzystny wpływ tego pierwiastka. LF powstaje głównie z oksydacyjnie zmodyfikowanych białek, których stężenie wzrasta w miarę starzenia się komórki plemnikowej. Konsekwencją tego jest upośledzenie funkcji plemnika i obniżenie podatności na mechanizmy naprawcze. Ponadto wzrost ilości utlenionych białek może spowodować spadek ATP w plemnikach, co może skutkować zaburzonym procesem hiperaktywacji [10].

WNIOSKI

1. Wapń korzystnie wpływa na ruchliwość plemników w fizjologicznym nasieniu.
2. Wysoki poziom wapnia stymuluje układ antyoksydacyjny plazmy nasienia w warunkach fizjologicznych.

PIŚMIENICTWO

1. Salsabili N, Mehrsai A.R., Jalaie S.: Concentration of blood and seminal plasma elements and their relationships with semen parameters in men with spinal cord injury. *Andrologia* 2009;41: 24-28.
2. Semczuk M., Kurpisz M.: *Andrologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.

3. Kasperczyk A., Kasperczyk S., Horak S. i wsp.: Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228: 378-384.
4. Hong C.Y., Chiang B.N., Turner P.: Calcium ion is the key regulator of human sperm function. *Lancet* 1984;2:1449 – 1451.
5. Skandhan K.P.; Review on copper in male reproduction and contraception. *Rev Fr Gynecol Obstet* 1992; 87: 594–598.
6. Breitbart H.: Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 139–144.
7. Suarez S.S.: Hyperactivated motility in sperm. *J Androl*, 1996; 17: 331–335.
8. Storey B.: Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 203-213.
9. Terman A, Brunk UT.: Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1400-1404.
10. Fraczek M., Kurpisz M.: The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 523-534.
11. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen V ed. Cambridge University Press 2010.
12. Oyanagui Y.: Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 1984; 142: 290-296.
13. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
14. Johansson L.H., Borg L.A.: A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples *Anal Biochem*. 1988; 174: 331-336.
15. Koster J.F., Biemond P., Swaak A.J.: Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1986; 45: 44-46.
16. Richterich R. *Chemia kliniczna*. Warszawa PZWL; 1971.
17. Erel O.: A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Bioch* 2005; 38: 1103–1111.
18. Jain S.K.: In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *J Clin Invest* 1985; 76: 281-286.
19. Shearer M.J., Lim C.K.: *HPLC of Small Molecules-a Practical Approach* Oxford: IRL Press 1986.
20. Aitken R., Harkiss D., Buckingham D. Relationship between ironcatalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 98: 257–265.
21. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S i wsp. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 2004; 70: 518-522.
22. Prien SD, Lox CD, Messer RH, i wsp. Seminal concentrations of total and ionized calcium from men with normal and decreased motility. *Fertil Steril.* 1990; 54: 171-182.
23. Wai Y, Wonga B, Flihc G i wsp. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol.* 2001; 51: 131–136.

Adres do korespondencji:

*dr n. med. Aleksandra Kasperczyk
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym
w Zabrze
Zakład Biochemii Ogólnej Katedry Biochemii w Zabrze
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze
tel. (32) 272 32 18
e-mail: akasperczyk@sum.edu.pl*