

İNFERTİL ERKEKLERDE İNDİRGENMİŞ GLUTATYON VE PENTOKSİFİLİN'İN SPERM FONKSİYON TESTLERİ VE MOTİLİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KIYASLANMASI

COMPARISON OF THE EFFECTS OF REDUCED GLUTATHIONE AND PENTOXIFYLLINE ON SPERM FUNCTION TESTS AND MOTILITY IN INFERTILE MALES

KALFAZADE, N.*, ALICI, B.**, İREZ, T.***, ÖZKARA, H.**, KARAMAN, İ.*,
YENCİLEK, F.**, ERGENEKON, E.*

ÖZET

Bu çalışmada bir fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin ile antioksidan bir ajan olan indirgenmiş glutatyonun sperm fonksiyon testleri, canlılığı ve motilitesi üzerine etkilerini kıyasladık.

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezinde in-vitro fertilizasyon programına alınan 30 infertil çift çalışmaya alınmıştır. Sperm yıkama işlemi için alınan her semen örneği üçe ayrılmış ve sırayla glutatyon (10 µmol), pentoksifilin (1 mg/mL) ve glutatyon + pentoksifilin (10 µmol + 1 mg/mL) ile inkübe edilmişlerdir. Sperm yıkama işlemi öncesi ve sonrası, hipo-ozmotik şişme testi, akrozom reaksiyon testi (AR test), sperm-insan oosit penetrasyon testi (SİÖP) sonuçları ve sperm motiliteleri kıyaslanmıştır.

Glutatyon, pentoksifilin ve pentoksifilin + glutatyon kombinasyonu ile inkübasyon öncesi ve sonrası motilite, canlılık, AR test pozitiflikleri kıyaslandığında hepsinde de inkübasyon öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur. Bu artışların glutatyon + pentoksifilin kombinasyonu ile daha belirgin oldukları görülmüştür. SİÖP'u sperm stimülasyonu öncesi negatif olan 12 hastadan dördünde glutatyon + pentoksifilin kombinasyonu ile test pozitif hale gelmiştir. Diğer gruplarda ise sadece birer tane SİÖP test pozitif hale gelmiştir.

Bizim çalışmamız sperm stimülasyonunda glutatyon ile pentoksifilin'in kombine kullanımın, sperm motilite ve fonksiyonlarını, her bir ajanın tek tek kullanımından daha etkin biçimde artırdığını göstermiştir. Dolayısıyla, yardımcı üreme tekniklerinde, spermin motilitesinin artırılmasında ve kapasitizasyonun desteklenmesinde pentoksifilin ile glutatyonun birlikte kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

ABSTRACT

To compare the effects of reduced glutathione which is an antioxidant and pentoxifylline which is a phosphodiesterase inhibitor on sperm functional tests, vitality and motility.

30 infertile couple who attended to Cerrahpaşa Medical Faculty, In-Vitro Fertilization Center were included in this study. Every semen sample taken for sperm washing process were divided into three and incubated with glutathione (10 µmol), pentoxifylline (1 mg/ml) and glutathione + pentoxifylline (10 µmol + 1 mg/ml) respectively. Before and after the sperm washing process, hypoosmotic swelling test, acrosome reaction test (AR test), sperm-human oocyte penetration test (SHOP) results and motility were compared.

There was an increase and the difference was statistically significant, when motility, vitality and AR test results were compared before and after the incubation with glutathione, pentoxifylline and glutathione + pentoxifylline. The increase was more obvious with glutathione + pentoxifylline combination. Four of twelve patients with negative SHOP test became positive after incubation with glutathione + pentoxifylline, while only one SHOP test became positive in each other groups.

This study revealed that stimulation of sperm with glutathione + pentoxifylline combination has increased sperm motility and improved sperm function test results better than glutathione and pentoxifylline alone. Therefore, we think that it may be helpful to use glutathione + pentoxifylline combination to increase sperm motility and support capacitation during assisted reproductive techniques.

ANAHTAR KELİMELEER: İnfertilite Glutatyon, pentoksifilin, sperm motilitesi

KEY WORDS: Infertility, Glutathione, Pentoxifylline, sperm motility

Dergiye geliş tarihi: 29.10.1998

Yayına kabul tarihi: 16.2.1999

* Şişli Etfal Hastanesi Üroloji Kliniği,

** Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, ve

*** Kadın Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Merkezi.

GİRİŞ

Fertilizasyon için spermatozoanın bir seri fizyolojik olaylardan geçmesi gerekmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinde, sperm motilitesinde artış, spermatozoa'nın oosit'e ulaşma ve birleşmesi ve akrozom reaksiyonunun başlatılması gibi fizyolojik olayların uyarılması için birçok madde ile sperm stimülasyonu değişik çalışmalarda denenmiştir.

Metil ksantin türevi olan pentoksifilin, bir fosfodiesteraz inhibitörüdür ve hücre içi siklik 3', 5'-adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini artırarak spermin flagellar hareketini uyardığı, hiperaktif hale getirdiği bildirilmiştir.^{1, 2, 3} Yardımcı üreme tekniklerinde sperm hazırlamada pentoksifilin stimülasyonu yapılmasının özellikle erkek faktörü olan infertilitede ovum fertilizasyon şansını arttırdığı bilinmektedir.^{2, 4}

Reaktif oksijen radikallerinin (ROS) sperm fonksiyon fizyopatolojisinde rolü olduğu son yıllarda belirtilmektedir.^{5, 8} Semende ROS üretiminin motiliteyi düşürdüğü, sperm-oosit penetrasyon kapasitesini azalttığı ve infertilite sebebi olabileceği bildirilmiştir.^{7, 9, 10} Çeşitli ilaçların alımı, solunum ve radyasyon, normalde de belirli bir oranda oluşan reaktif oksijen radikallerini arttırmaktadır. Glutatyonun ise ROS'i yok etmekte önemli rolü vardır.¹¹ Glutatyon'un sperm kromatin yapısına olumsuz etkisinin bulunmadığı, sperm motilitesinin düşüşünü önlediği ve akrozom reaksiyonunda ise etkili olduğu bildirilmiştir.^{11, 12}

Bu çalışmamızın amacı yardımcı üreme tekniklerinde sperm stimülasyonu için kullanılan ve bir fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin ile antioksidan bir ajan olan indirgenmiş glutatyonun sperm fonksiyonları (Sperm insan oosit penetrasyonu, akrozom reaksiyonu), canlılığı ve motilitesi üzerine etkilerini kıyaslamaktır.

YÖNTEM VE GEREÇ

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezine başvuran 30 infertil hasta çalışmaya alınmıştır. Hastaların ortalama yaşı 27.2 (22-38), infertilite süresi ise ortalama 38 ay (20-76) idi. Hastaların eşlerinin jinekolojik muayene bulgularında bir patoloji saptanmamıştır.

Glutatyon doz seçimi:

İnkubasyon için glutatyon dozunun seçimi amacıyla bir ön çalışma yapılmıştır. Bu ön çalışmada 15 hastadan alınan semen örnekleri değişik dozlarda, sırasıyla 5, 10 ve 50 µmol glutatyon ile inkübe edilmiştir. 5, 10 ve µmol glutatyon dozları ile stimülasyon öncesi ve sonrası sperm motilitesinde artış, akrozom reaksiyonunda artış ve hipo-osmotik şişme testinde pozitiflikteki artış, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.0001$ ve $p<0.001$). Bu sonuçlara göre, 10 µmol glutatyon ile inkubasyonda 5 ve 10 µmol glutatyon ile inkubasyona göre daha iyi sonuçlar elde edildiğinden, çalışmamızda sperm stimülasyonu için 10 µmol glutatyon kullanılmıştır.

Pentoksifilin dozu ise 3.6 mM/L (1 mg/ml) olarak seçilmiştir. 30 hastadan alınan semen örnekleri swim-up sonrası üç bölüme ayrılmış ve her biri 10 µmol glutatyon, 3.6 mM/L pentoksifilin ve 10 µmol glutatyon+3.6mM/L pentoksifilin kombinasyonu ile %95 O₂ + %5CO₂ atmosferde, 37°C de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkubasyon öncesi ve sonrası sperm motilitesi, hipo-osmotik şişme (HOS) testi, akrozom reaksiyon (AR) testi ve sperm-insan oosit penetrasyon (SİOP) test sonuçları kıyaslanmıştır.

HOS test değerlendirmesi:

Her bir örnek 1/5 hipo-osmotik mediumda (150 mosm. NaCitate/fruktoz) bir saat inkübe edilmiş ve spermin şişmesi izlenmiştir.

Akrozom reaksiyon testi değerlendirilmesi:

Örnekler C-ionophore A 231 187 (Sigma) ile üç saat inkübe edilerek akrozom reaksiyonu uyarılmıştır. Reaksiyon pozitif olan spermlerin yüzdesi inkubasyon öncesi ve sonrası ile kıyaslanmıştır.

Sperm-insan oosit penetrasyon test değerlendirilmesi:

Sperm penetrasyon testi için üçüncü günde kullanılmamış insan oositleri kullanılmıştır. İnkubasyon öncesi ve sonrası zona pellusida penetrasyonunun olması pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Motilite değerlendirilmesi:

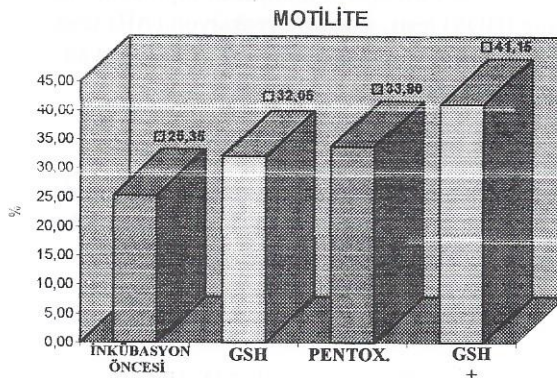
1992 WHO kriterlerine göre yapılmıştır. Her örnekte grade 1 ve 2 motiliteler değerlendirilerek kıyaslanmıştır.

İstatistiksel analiz:

Tüm değerler için ortalama ve standart sapmalar hesaplanmıştır. Glutatyonun etkin dozunun bulunması ve pentoksifilin ile glutatyonun etkilerinin kıyaslanmasında t-test kullanılmıştır. SİOP testinde, örnek azlığı nedeni ile, sadece penetrasyon sayıları bildirilmiştir.

BULGULAR

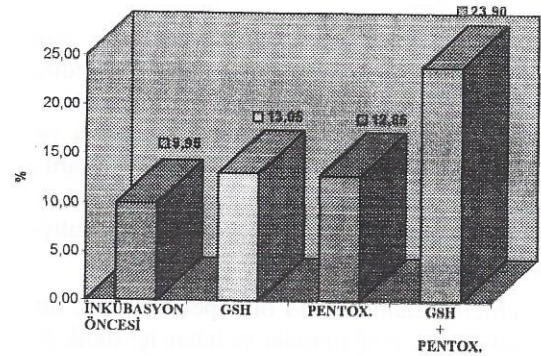
Çalışmamızda inkübasyon öncesi ve sonrası motiliteler kıyaslandığında, glutatyon ve pentoksifilin'in tek başlarına motiliteyi anlamlı biçimde arttırdıkları (sırayla $p<0.003$ ve $p<0.001$) görülmüştür. Glutatyon+pentoksifilin kombine kullanıldığında ise motilitedeki artış daha da belirgin bulunmuştur ($p<0.0001$) (Şekil 1).



Şekil 1. Motilitenin, GSH, pentoksifilin ve GSH + pentoksifilin ile inkübasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırılması. Değerler ortalama değerlerdir. Bütün p değerleri inkübasyon öncesi ve sonrasına ait sonuçlardır. (GSH: Glutatyon)

Akrozom reaksiyon test sonuçları kıyaslandığında da, kombinasyon ile stimülasyonun AR test pozitifliğini artırıcı etkisinin, glutatyon veya pentoksifilin'in tek başlarına kullanımından daha belirgin olduğu görülmüştür (sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.001$ ve $p<0.001$) (Şekil 2).

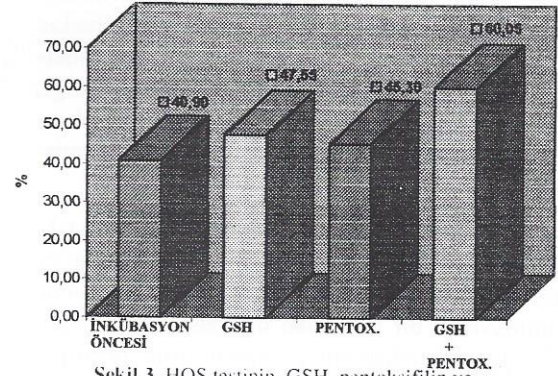
AKROZOM REAKSİYONU



Şekil 2. AR testinin, GSH, pentoksifilin ve GSH + pentoksifilin ile inkübasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırılması. Değerler ortalama değerlerdir. Bütün p değerleri inkübasyon öncesi ve sonrası sonuçlardır.

Hipo-ozmotik şişme testinde pozitifliğin artışı kıyaslandığında, glutatyon ve pentoksifilin'in yine anlamlı biçimde pozitifliği arttırdığı (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.013$), ancak glutatyon + pentoksifilin kombinasyonu ile bu artışın istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu ($p<0.0001$) görülmüştür (Şekil 3).

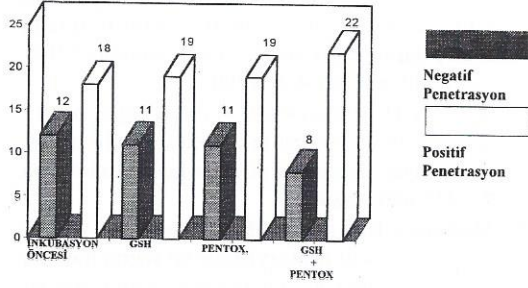
HİPO-OZMOTİK ŞİŞME



Şekil 3. HOS testinin, GSH, pentoksifilin ve GSH+pentoksifilin ile inkübasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırılması. Değerler ortalama değerlerdir. Bütün p değerleri inkübasyon öncesi ve sonrasının sonuçlarıdır.

Glutatyon + pentoksifilin ile inkübasyon öncesi SİOP testi negatif olan 12 hastadan 4'ü inkübasyon sonrası pozitif hale gelmiştir. Tek başına glutatyon veya pentoksifilin ile inkübasyon sonrası ise, 12 hastadan sadece birer tanesi pozitif hale gelmiştir. (Şekil 4).

İNDİRGENMİŞ GLUTATYON VE PENTOKSİFİLİN'İN SPERM ÜZERİNE ETKİLERİ



ŞEKİL 4. S.I.O.P. testinin, GSH, pentoksifilin ve GSH + pentoksifilin ile inkübasyon

Şekil 4. S.I.O.P. testinin, GSH, pentoksifilin ve GSH + pentoksifilin ile inkübasyon öncesi ve sonrasında karşılaştırılması.

TARTIŞMA

Pentoksifilin, diğer metilksantin türevleri gibi, bir fosfodiesteraz inhibitörüdür ve hücre içi cAMP yıkımını azaltarak dolaylı olarak cAMP etkinliğini artırır.^{13, 14} Kapasitizasyon sırasında, bir devrede, hücre için cAMP seviyesinin yükseldiği ve cAMP'nin sperm motilitesini artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir.^{15, 17} Pentoksifilin'in akrozom reaksiyonunu iyileştirdiği ve zona-free hamster oositlerine sperm penetrasyon yeteneğini artırdığı bildirilmektedir.^{18, 19} Bizim bulgularımız da motilite, AR testi sonuçları ve SİOP testi sonuçları bakımından literatür ile uyumludur.

Pentoksifilin'in sperm motilitesini arttırmasına ilişkin literatürdeki farklı sonuçların farklı dozlarda ve sürede pentoksifilin kullanımına bağlı olabileceği bildirilmiştir.²⁰ Biz genel olarak sperm motilitesini maksimum düzeyde arttırdığı düşünülen ve rutin olarak kullanılan 3.6 mM/L (51 mg/ml) pentoksifilin dozunu çalışmamızda kullandık.

Önemli miktarlarda glutatyonun memeli seminal plazmasında mevcut olduğu bildirilmektedir.^{21, 22} Glutatyon aynı zamanda hücre zarını geçebilmekte ve hücre içi konsantrasyonlarında artışa sebep olabilmektedir.²³ Oral glutatyon alımının strese bağlı gastrit oluşumunu azalttığı da bildirilmiştir.²⁴ Bizim çalışmamızda glutatyonun tek başına ve pentoksifilin ile kombine kullanımı ile sperm motilitesini, akrozom reaksiyonunu ve HOS test pozitifliğini istatistiksel olarak anlamlı

biçimde arttırdığı gözlemlenmiştir. Sperm fonksiyon ve motilitesindeki bu iyileşmenin pentoksifilin'in glutatyon ile kombine kullanımında daha belirgin olduğu göze çarpmaktadır.

Glutatyonun serbest radikalleri yok ettiği ve reaktif oksijen radikallerinde azalmaya yol açtığına dair bulgular mevcuttur.^{11, 12} Glutatyon hemen tüm hücrelerde çoğunlukla yüksek oranlarda bulunmakta ve bir çeşit redoks tampon olarak görev görmektedir.²⁴ Muhtemel etkisini proteinlerin sulfhidril gruplarını indirgenmiş halde ve heme demirini ferröz (Fe^{+2}) durumunda tutarak gösterdiği düşünülmektedir.²⁴ Bizim çalışmamızda glutatyonun sperm motilitesini arttırması ve sperm fonksiyonlarını olumlu etkilemesi onun antioksidan özelliklerine bağlı olabilir.

Glutatyonun stimülasyon için kullanılacak etkin dozunun seçimi için yapılan ön çalışmada, yüksek glutatyon dozlarının sperm motilitesi ve fonksiyonlarını yeterince arttırmadığı görülmüştür. Pentoksifilin için yapılan bir etkinlik çalışmasında, doz-etki ilişkisini gösteren şemada optimum pentoksifilin dozunun aşılması halinde stimülasyon etkisinin artmak veya sabit kalmak yerine düştüğü gözlemlenmiştir.²⁵ Benzer şekilde, pentoksifilin için yapılan etkinlik çalışmalarında olduğu gibi, glutatyonun da etkin olduğu optimum bir dozun varlığı düşünülebilir. Bizim çalışmamızda bu doz 10 μ mol olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, değişik mekanizmalarla da olsa, gerek antioksidan olan glutatyon, gerekse fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin sperm motilitesini arttırmış ve sperm fonksiyonlarını olumlu etkilemiştir. Bizim çalışmamız glutatyon ile pentoksifilin'in kombine kullanımının, sperm motilite ve fonksiyonlarını her bir ajanın tek tek kullanımından daha etkin biçimde arttırdığını göstermiştir. Dolayısıyla, yardımcı üreme tekniklerinde kullanılacak spermin motilitesinin artırılmasında ve kapasitizasyonun desteklenmesinde pentoksifilin ile glutatyonun birlikte kullanılabilirliğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Tash JS, Means AR: Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. Biol Reprod. 28: 784-92, 1983.

- 2- Yovich JL: Pentoxifylline: actions and application in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 8: 1786-91, 1993.
- 3- Kay VJ, Joutts JRT, Robertson L: Effects of pentoxifylline on human spermatozoa hyperactivation. *Hum. Reprod.* 8: 727-73, 1993.
- 4- Yovich JM, Edirishingle WR, Cummins JM, Yovich JL: Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertil Steril* 53: 715-22, 1990.
- 5- Jones R, Mann T, Sherins R: Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril.* 31: 531-37, 1979.
- 6- Alvarez JG, Storey BT: Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23: 77-90, 1989.
- 7- Aitken RJ, Clarkson JS: Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. and Fertil.* 81: 549-69, 1987.
- 8- Zalata A, Hafez T, Comaire F: Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum. Reprod.* 10: 1444-51, 1995.
- 9- Aitken RJ, Irvine MD, Wu FC: Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J Obstet. Gynecol.* 164: 542-51, 1989.
- 10- De Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* 13: 368-78, 1992.
- 11- Lenzi A, Picardo M, Gandeni L et al: Glutathione treatment of dyspermia; effect on lipid peroxidation process. *Hum. Reprod.* 9: 2044-50, 1994.
- 12- Griveaue JF, Dumont E, Renard P et al: Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod. and Fertil.* 103: 1-10, 1995.
- 13- Aitken RJ, Mattei A, Irvine S: Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine. *J Reprod. Fertil.* 78: 515-527, 1986.
- 14- Ward A, Clissold SP: Pentoxifylline-a review of its pharmacodynamic properties and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 34: 50-97, 1987.
- 15- Fraser LR: Adenosine and its analogues, possible acting at A2, stimulate mouse sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. *J Reprod. Fertil.* 89: 467-470, 1990.
- 16- Ishikawa H, Tomomasa H, Yoshii S et al: Correlation between the sperm motility and the adenylate cyclase activity in infertile men. *Andrologia.* 21: 437-440, 1989.
- 17- McKinney KA, Lewis SEM, Thompson W: Persistent effects of pentoxifylline on sperm motility, after drug removal, in normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Andrologia.* 26: 235-240, 1994.
- 18- Cummins JM, Pember SM, Jequier AM et al: A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge (ARIC). Relationship to fertility and other semen parameters. *J. Androl.* 12: 98-103, 1991.
- 19- Lambert HL, Steinleitner A, Eiserman J et al: Enhanced gamete interaction in the sperm penetration assay after coincubation with pentoxifylline and human follicular fluid. *Fertil Steril.* 58: 1205-1208, 1992.
- 20- Poul M, Sumpter JP, Lindsay KS: Action of pentoxifylline directly on semen. *Hum. Reprod.* 10: 354-359, 1995.
- 21- Daunter B, Hill R, Hennessey J et al.: Preliminary report: a possible mechanism for the liquefaction of human seminal plasma and its relationship to spermatozoal motility. *Androl.* 13: 131-141, 1981.
- 22- Alvarez JG, Tothstone JC: Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl.* 8: 338-348, 1987.
- 23- Meister A, Taniguchi H et al: Biochemistry of glutathione; in Taniguchi N, Higashi T, Sakamoto Y (eds): *Glutathione Centennial. Molecular Perspectives and Clinical Implications.* Academic Press, New York, pp. 3-21, 1989.
- 24- Inoue M, Hiroto M, Sugi K et al: Dynamic aspect of glutathione metabolism and transport during oxidative stress. in Taniguchi N, Higashi T, Sakamoto Y (eds): *Glutathione Centennial. Molecular Perspectives and Clinical Implications.* Academic Press, New York, pp. 381-393, 1989.
- 25- Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS: Action of pentoxifylline directly on semen. *Hum Reprod.* 10: 354-359, 1995.