

## Związek między astenozoospermią a wybranymi parametrami makroskopowymi, mikroskopowymi i biochemicznymi nasienia

### Relationship between asthenozoospermia and selected macroscopic, microscopic and biochemical semen parameters

Anna Świerczyńska-Cieplucha, Katarzyna Marchlewska, Renata Walczak-Jędrzejowska, Eliza Filipiak, Jolanta Słowikowska-Hilczer

Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

#### Streszczenie

Astenozoospermia to zaburzenie ruchliwości plemników, w którym według definicji WHO (World Health Organization) z 2010 r. <32% plemników wykazuje ruch postępowy. Wśród przyczyn męskiej niepłodności astenozoospermia stanowi blisko 19%.

Celem pracy było określenie związku między astenozoospermią a wybranymi parametrami makroskopowymi, mikroskopowymi i biochemicznymi nasienia.

Badano nasienie 112 mężczyzn z niepłodnych par. Przeprowadzono podstawowe badanie nasienia metodą manualną wg zaleceń WHO z 2010 r. Oceniano parametry makroskopowe (objętość, pH) i mikroskopowe (całkowita liczba i koncentracja plemników, odsetek plemników żywotnych i z prawidłową morfologią). Parametry biochemiczne (aktywność  $\alpha$ -glukozydazy obojętnej – marker czynności najądrzy, stężenie fruktozy – marker czynności pęcherzyków nasiennych, i kwasu cytrynowego – marker czynności gruczołu krokowego) w plazmie nasienia oceniano metodą spektrofotometryczną.

U pacjentów z astenozoospermią stwierdzono statystycznie istotne obniżenie objętości ejakulatu, niższą całkowitą liczbę plemników oraz niższy odsetek żywotnych plemników, a także niższe stężenia fruktozy i kwasu cytrynowego w porównaniu do mężczyzn bez astenozoospermii.

Stwierdzono istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy odsetkiem plemników wykazujących ruch postępowy a objętością ejakulatu, koncentracją i całkowitą liczbą plemników oraz odsetkiem plemników z prawidłową żywotnością i morfologią, a także całkowitym stężeniem fruktozy w ejakulacie.

Wnioski: Astenozoospermia może się wiązać z nieprawidłowymi parametrami makroskopowymi i mikroskopowymi nasienia takimi jak obniżona objętość ejakulatu, obniżona liczebność plemników oraz zmniejszony odsetek plemników żywotnych i o prawidłowej morfologii, a także z obniżonymi wartościami parametrów biochemicznych nasienia. Współwystępowanie nieprawidłowych parametrów makroskopowych, mikroskopowych i biochemicznych nasienia, może wskazywać na wspólny czynnik etiologiczny tych zaburzeń.

#### Summary

Asthenozoospermia is a sperm motility disorder in which <32% of spermatozoa show progressive motility, according to the World Health Organization definition (WHO, 2010). Among causes of male infertility asthenozoospermia accounts for nearly 19%.

The aim of the study was to determine the relationship between asthenozoospermia and selected macroscopic, microscopic and biochemical parameters of semen.

The semen of 112 males from infertile couples was studied. Basic sperm analysis was performed by manual method according to the WHO 2010 guidelines. Macroscopic parameters (volume, pH) and microscopic (total sperm number and concentration, percentage of vital spermatozoa and with normal morphology) were evaluated. Biochemical parameters (neutral  $\alpha$ -glucosidase activity – epididymis activity marker, fructose concentration – seminal vesicles activity marker, and citric acid – prostatic activity marker) were evaluated by spectrophotometric method.

Patients with asthenozoospermia had a statistically significant decrease in the ejaculate volume, lower total sperm number and lower percentage of vital sperms, as well as lower fructose and citric acid concentrations in comparison to those without asthenozoospermia. There were statistically significant positive correlations between the percentage of spermatozoa showing progressive movement and the ejaculate volume, total number and concentration of spermatozoa, percentage of with normal vitality and morphology, as well as total fructose concentration in the ejaculate.

Conclusions: Asthenozoospermia may be associated with abnormal macroscopic and microscopic semen parameters such as reduced ejaculate volume, reduced sperm count, reduced spermatozoa and normal morphology, and reduced biochemical parameters. Co-occurrence of abnormal macroscopic, microscopic and biochemical parameters of semen may indicate a common etiological factor for these disorders.

**Słowa kluczowe:** nasienie,  $\alpha$ -glukozydaza obojętna, fruktoza, kwas cytrynowy, niepłodność, asthenozoospermia

**Key words:** semen, neutral  $\alpha$ -glucosidase, fructose, citric acid, infertility, asthenozoospermia

## Wstęp

Problem niepłodności dotyczy 50 do 80 milionów osób na świecie, co wskazuje, że około 15% par w wieku reprodukcyjnym ma problem z uzyskaniem potomstwa [1]. Prawidłowa ruchliwość plemników jest jednym z istotnych parametrów wpływających na płodność u mężczyzn [2, 3]. Prawidłowy ruch plemników oraz ich zdolność do hiperaktywacji odgrywa istotną rolę w czasie migracji z pochwy do bańki jajowodu (miejsca zapłodnienia), podczas penetracji przez wieniec promienisty i osłonkę przejrzystą komórki jajowej, a także podczas fuzji z komórką jajową. Plemniki nabywają zdolność do ruchu w głowie oraz w trzonie najądrza podczas procesu dojrzewania, który związany jest z ich fizjologicznymi, biochemicznymi oraz morfologicznymi przemianami [4].

Asthenozoospermia określa się zmniejszony odsetek plemników wykazujących ruch postępowy w nasieniu, według definicji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO; *World Health Organization*) z 2010 roku – <32%. [5]. Asthenozoospermia jest przyczyną blisko 19% przypadków niepłodności [6]. Przyczyny obniżonej ruchliwości plemników mogą być wrodzone np. zaburzona czynność mitochondriów [7], zaburzony układ mikrotubul aksonemy w witkach [8, 9], brak witki [10] lub nabyte np. zaburzona czynność gruczołów dodatkowych męskiego układu płciowego tj. pęcherzyków nasiennych i gruczołu krokowego oraz nieodpowiedni skład plazmy nasienia, która w warunkach fizjologicznych zawiera substancje wpływające na dojrzewanie i metabolizm plemników [11]. Zaburzenie czynności pęcherzyków nasiennych i gruczołu krokowego często bywa spowodowane infekcjami w układzie moczowo-płciowym, obecnością żyłaków powrózka nasiennego, a także obniżonym stężeniem testosteronu [12, 13]. Czynniki te mogą wpływać także na inne parametry nasienia obniżając w jeszcze większym stopniu potencjał płodności mężczyzny.

Celem pracy było określenie związku między ruchliwością plemników a: 1) parametrami makroskopowymi nasienia, takimi jak objętość i pH ejakulatu, 2) parametrami mikroskopowymi nasienia, takimi jak liczba i koncentracja plemników oraz odsetek plemników żywych i z prawidłową morfologią, 3) parametrami biochemicznymi plazmy nasienia, takimi jak aktywność  $\alpha$ -glukozydazy obojętnej (NAG; *neutral  $\alpha$ -glucosidase*) (parametr czynności najądrzy i drożności dróg wyprowadzających plemniki), stężenie fruktozy (parametr czynności pęcherzyków nasiennych) i stężenie kwasu cytrynowego (parametr czynności gruczołu krokowego).

## Materiał i metody

W badaniu wzięło udział 112 mężczyzn w wieku 25-51 lat (średnio 33,3 lata) z niepłodnych par (według definicji WHO: brak ciąży

po przynajmniej roku regularnego współżycia bez stosowania antykoncepcji), którzy zgłosili się do Poradni Andrologii i Endokrynologii Płodności Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi na badanie nasienia. Pacjenci zostali pisemnie i ustnie poinformowani o celu i procedurze badania. Każdy wyraził świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu.

W grupie tej znalazło się 9 mężczyzn z azoospermia (8%) oraz 2 z kryptoospermia (pojedyncze plemniki w odwirowanym osadzie) (1,8%), których wyniki nie były włączone do dalszych analiz. W oparciu o wyniki podstawowego badania nasienia wyodrębniono dwie grupy: 1) z asthenozoospermia (AST) tj. <32% plemników z ruchem postępowym w ejakulacie – 62 mężczyzn, oraz 2) bez asthenozoospermii (K) tj.  $\geq$ 32% plemników z ruchem postępowym w ejakulacie – 39 mężczyzn.

Podstawowe badanie nasienia zostało wykonane metodą manualną zgodnie z procedurami opisanymi w podręczniku pt. „WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition” wydanym przez WHO w 2010 roku [4].

Nasienie do badania uzyskano poprzez masturbację po okresie wstrzemięźliwości płciowej od 2 do 7 dni. Po upłynięciu nasienia oceniano parametry makroskopowe nasienia, takie jak objętość i pH. Objętość nasienia określano metodą wagową z zastosowaniem wagi WTG 200 (Radwag, Radom, Polska). Odczyn pH nasienia został oznaczony zaraz po upłynięciu nasienia z dokładnością do 0,2, przy użyciu papierka wskaźnikowego MColorpHast (zakres pH 6,5-10,0) (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy).

Badanie mikroskopowe nasienia przeprowadzono przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse E200 (Tokyo, Japonia). Obejmowało ono manualną ocenę ruchliwości, żywotności, morfologii oraz koncentracji i całkowitej liczby plemników. Ruchliwość plemników została oceniona w trzech kategoriach (ruch postępowy, w miejscu i brak ruchu) i wyrażona jako odsetek. Żywotność plemników oceniono poprzez wyznaczenie odsetka żywych plemników za pomocą testu eozynowego opartego na właściwościach przepuszczalności błony komórkowej plemnika dla tego barwnika (plemniki żywe – bezbarwne, plemniki martwe – czerwone lub różowe). Morfologię plemników oceniano po zabarwieniu ich metodą Diff-Quik (Dade Behring Inc, Newmark, USA), analizując budowę główki (z uwzględnieniem wakuolizacji), wstawki, witki oraz obecność przywieszki cytoplazmatycznej. Wynik wyrażony został jako odsetek plemników o prawidłowej budowie. Ocena koncentracji plemników została przeprowadzona za pomocą rozszerzonej komory Neubauera (Heine Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Niemcy), a wynik wyrażono

w milionach w jednym mililitrze (mln/ml). Całkowitą liczbę plemników uzyskano poprzez iloczyn koncentracji plemników oraz objętości ejakulatu.

Plazma do przeprowadzenia procedury badawczej została uzyskana z tych samych ejakulatów, w których wykonano podstawowe badanie nasienia. Próbkę nasienia po 1 godzinie od ejakulacji odwirowano przy 3000g przez 15 minut (wirówka Heraeus Labofuge 400R, ThermoScientific, USA). Supernatant był przechowywany w zamrażarce w temperaturze -20°C przez okres do 7 dni. Ocenę aktywności NAG, stężenia fruktozy oraz kwasu cytrynowego przeprowadzono przy pomocy gotowych zestawów odczynników dla badanego związku (FertiPro N.V., Belgia) zgodnie z zaleceniami producenta.

Ocenę aktywności NAG przeprowadzono metodą spektrofotometryczną. Zasada metody oparta jest na konwersji 4-paranitrofenylu- $\alpha$ -D-glukopyranozy (PNPG) do  $\alpha$ -D-glukopyranozy oraz 4-paranitrofenolu (PNP) w temperaturze 37°C oraz pH 6,8. Żółtą barwę mieszaninie reakcyjnej nadał 4-paranitrofenol, dzięki czemu absorbowała światło przy długości fali  $\lambda = 405$  nm, co umożliwiło wykorzystanie metody spektrofotometrycznej (spektrofotometr LT-4000, Labtech International Ltd, Anglia). Aktywność kwaśnej formy  $\alpha$ -glukozydazy, produktu gruczołu krokowego, została selektywnie zahamowana poprzez dodanie 1% siarczanu dodecylu sodu (SDS, ang. *sodium dodecyl sulfate*). Mieszaninę hamującą (PNPG zawieszony w dimetylosulfotlenku, ang. *dimethyl sulfoxide* – DMSO) zastosowano jako próbę ślepą w celu wyeliminowania wpływu barwy roztworu reakcyjnego na pomiar. Aktywność NAG wyliczano według wzoru:

$$\text{Aktywność NAG (mIU/ml)} = (\text{Amr} - \text{Amh}) / b \times 0,479$$

gdzie:

NAG –  $\alpha$ -glukozydaza obojętna (ang. *neutral  $\alpha$ -glucosidase*),

Amr – absorbcja próbki mieszaniny reakcyjnej,

Amh – absorbcja próbki mieszaniny hamującej,

b – współczynnik regresji liniowej,

0,479 – stała wynikająca z reakcji chemicznej, gdzie 1 mIU NAG uwalnia 1  $\mu$ mol PNP.

Oznaczenie stężenia fruktozy w plazmie nasienia zostało oparte na reakcji fruktozy z indolem, w wyniku której powstał kompleks o zabarwieniu brązowym, maksymalnie absorbujący światło przy długości fali  $\lambda = 492$  nm. Określano stężenie badanego związku na podstawie krzywej kalibracyjnej.

Ocena stężenia kwasu cytrynowego w plazmie nasienia oparta była na reakcji kwasu cytrynowego z jonami  $\text{Fe}^{3+}$ , w wyniku której powstał kompleks o zabarwieniu żółtym, absorbujący światło przy długości fali  $\lambda = 405$  nm. Wyliczano stężenie badanego związku według wzoru:

$$\text{Cca} = A \text{ próbki} / A \text{ standardu} \times 20,8 \mu\text{mol/ml}$$

gdzie:

Cca – stężenie kwasu cytrynowego ( $\mu$ mol/ml)

A próbki – absorbcja próbki

A standardu – absorbcja roztworu standardowego dołączonego do zestawu

20,8  $\mu$ mol/ml – stężenie gotowego roztworu fruktozy

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13 (StatSoft, Tulsa, USA). Porównano wartości następujących parametrów nasienia w badanych grupach pacjentów: objętość, pH, liczbę i koncentrację plemników, odsetek plemników żywotnych i z prawidłową morfologią, oraz aktywność NAG, stężenie fruktozy, stężenie kwasu cytrynowego. Normalność rozkładu zmiennych zweryfikowano testem Shapiro-Wilka. W przypadku wszystkich analizowanych danych stwierdzono istotne ( $p < 0,05$ ) różnice obserwowanych rozkładów wyników od teoretycznego rozkładu normalnego. Ze względu na to, w celu wykonania analizy porównawczej pomiędzy badanymi grupami zastosowano nieparametryczny test ANOVA Kruskala-Wallisa. W celu oceny korelacji wykorzystano współczynnik rang Spearmana (R). Do interpretacji siły zależności pomiędzy badanymi parametrami zastosowano skalę gdzie: wartość współczynnika  $R < 0,2$  oznacza brak zależności,  $0,2 - 0,4$  słabą zależność,  $0,4 - 0,7$  zależność umiarkowaną,  $0,7 - 0,9$  zależność silną, natomiast  $> 0,9$  zależność bardzo silną. Analizy przyjęto za statystycznie istotne przy poziomie istotności  $p < 0,05$ .

Tabela I. Wyniki podstawowego badania nasienia oraz testów biochemicznych plazmy nasienia 101 (nie uwzględniono przypadków azoo- i) mężczyzn z nieplodnych par.

Parametr	średnia $\pm$ SD	Mediana	Zakres
Wiek (lata)	33,3 $\pm$ 6,0	33,0	25,0–51,0
Objętość (ml)	3,6 $\pm$ 1,7	3,4	0,3–9,3
Koncentracja plemników (mln/ml)	20,8 $\pm$ 29,7	11,2	0,2–156,5
Całkowita liczba plemników (mln/ejakulat)	73,1 $\pm$ 109,2	28,0	0,3–500,8
Plemniki ruchliwe (%)	38,6 $\pm$ 20,0	37,0	0,0–79,0
Plemniki o ruchu postępowym (%)	26,5 $\pm$ 19,0	22,0	0,0–71,0
Plemniki z brakiem ruchu (%)	61,4 $\pm$ 19,0	63,0	21,0–100,0
Żywotność plemników (% plemników eozynonegatywnych)	62,6 $\pm$ 18,6	67,0	14,0–89,0
Plemniki o prawidłowej morfologii (%)	3,7 $\pm$ 2,0	3,0	0,0–12,0
$\alpha$ -glukozydaza obojętna (NAG) (mIU/ejakulat)	56,8 $\pm$ 17,0	43,0	2,3–272,1
Fruktoza ( $\mu$ mol/ ejakulat)	58,1 $\pm$ 3,0	44,4	0,0–322,3
Kwas cytrynowy ( $\mu$ mol/ ejakulat)	77,3 $\pm$ 2,0	63,9	3,0–257,4

(SD) – średnia arytmetyczna (odchylenie standardowe)

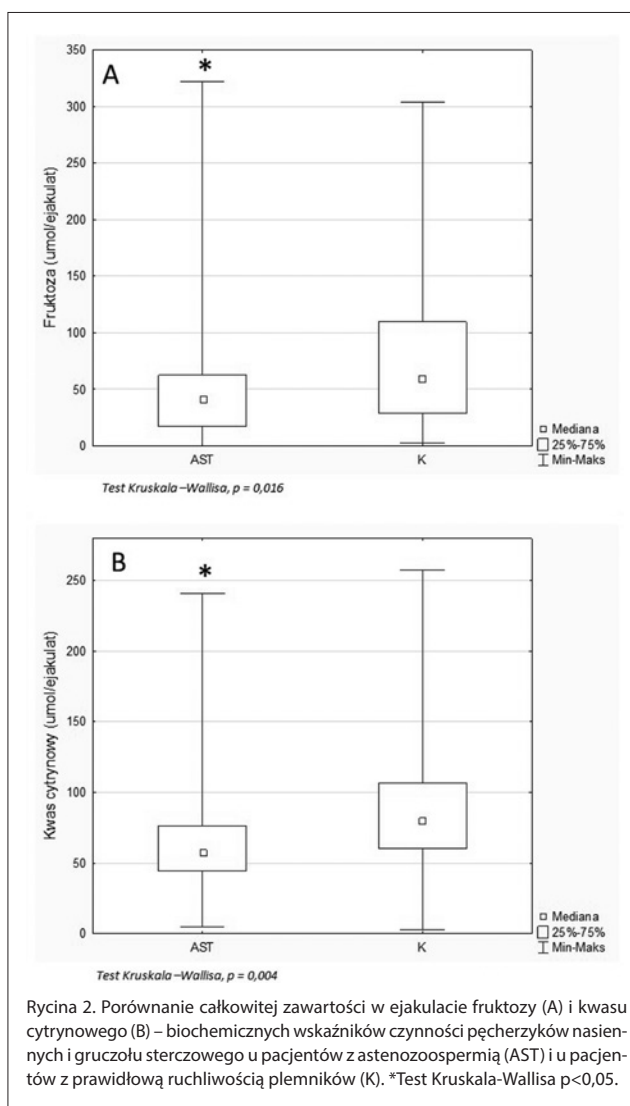
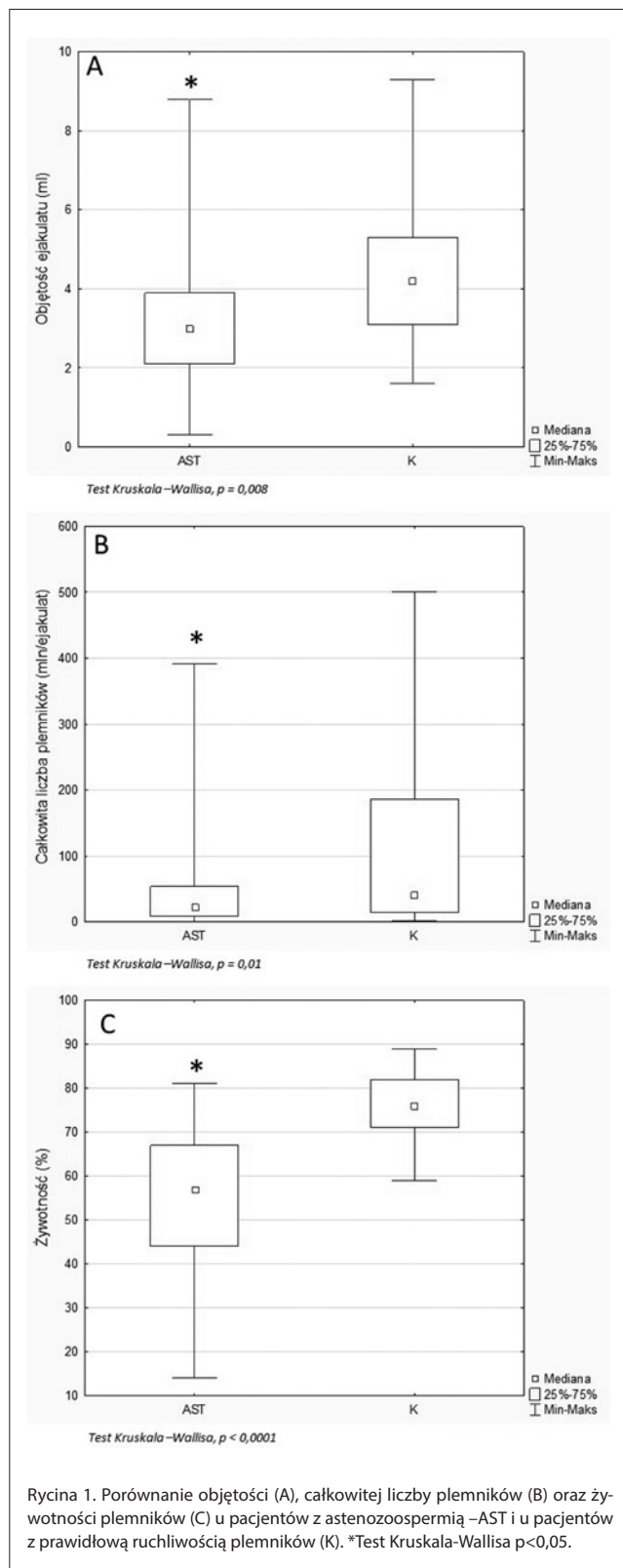
## Wyniki

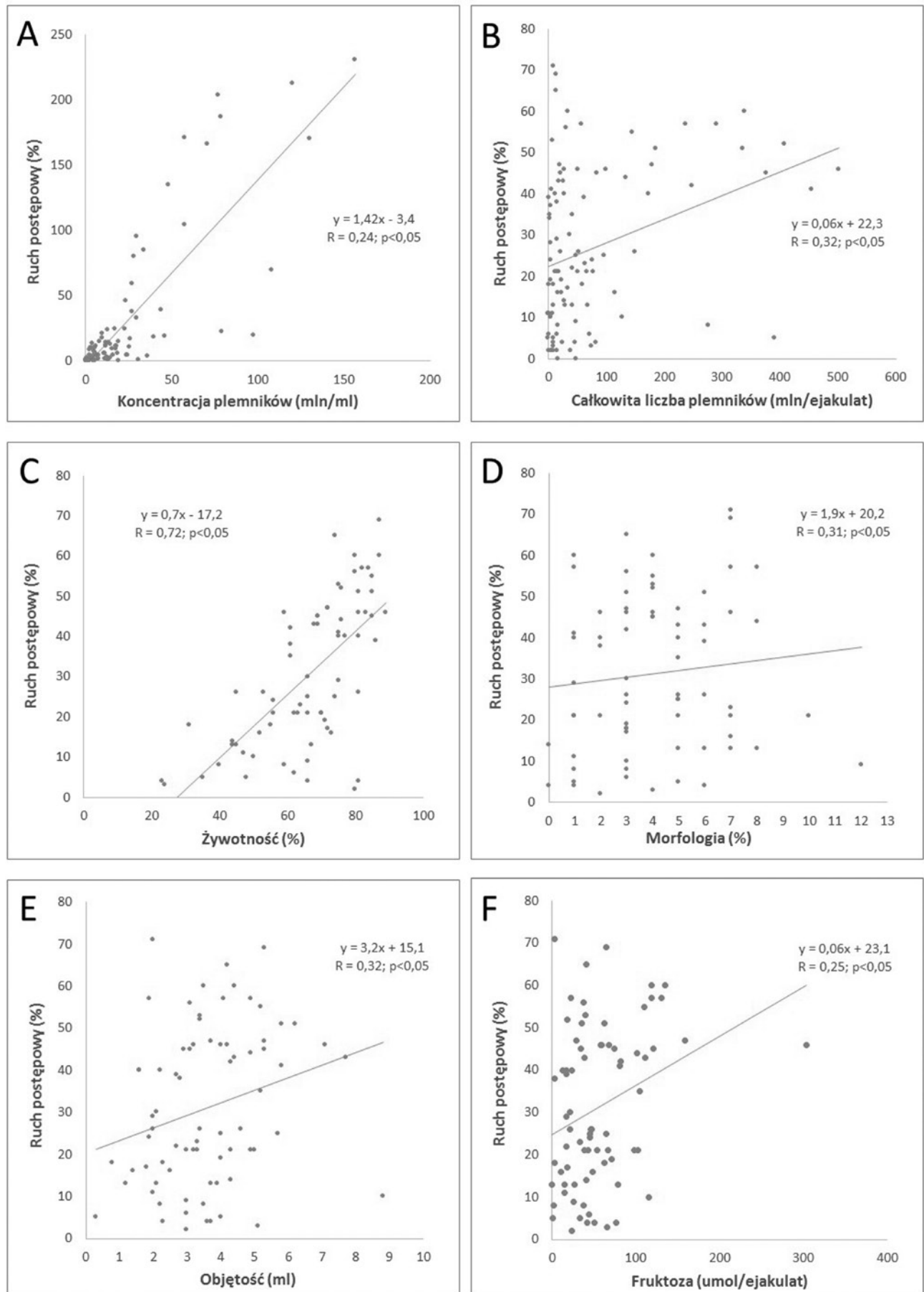
Wyniki podstawowego badania nasienia oraz testów biochemicznych plazmy nasienia przedstawiono w tabeli I. Normozoospermie stwierdzono tylko u 12 pacjentów (11,9% badanych). Poza astenozoospermia, którą stwierdzono u 61,4% badanych, obserwowano również zaburzenia innych parametrów nasienia. Objętość nasienia w 6 przypadkach była obniżona (5,9%). Zakres pH wynosił od 6,8 do 9,0. U 2 pacjentów stwierdzono wartości pH poniżej 7,2 uznane przez WHO [4] za dolną wartość referencyjną, natomiast u 22

pacjentów wartość pH była wysoka ( $\geq 8,5$ ). Żywotność plemników u 28,7% pacjentów była obniżona ( $< 58\%$  plemników żywych). Obserwowano również obniżenie całkowitej liczby plemników ( $< 39$  mln/ejakulat) u 58 pacjentów (57,4%), a koncentracji ( $< 15$  mln/ml) u 63 (62,4%). Brak plemników w nasieniu (azoospermie) stwierdzono w 8% przypadków. U 10 mężczyzn koncentracja plemników była niższa niż 400/ml, a wtedy określenie odsetka plemników o prawidłowej morfologii obarczone jest zbyt dużym błędem. Ocenę morfologii plemników przeprowadzono więc w ejakulatach 91 pacjentów. Teratozoospermie ( $< 4\%$  plemników o prawidłowej budowie) stwierdzono u 48 badanych mężczyzn (52,7%).

W testach biochemicznych plazmy nasienia stwierdzono obniżenie aktywności NAG (norma:  $> 20$  mIU/ejakulat) w 25 przypadkach (24,8%). W przypadku azoospermii nasienie 6 spośród 9 mężczyzn (67%) wykazywało obniżoną aktywność NAG, co wskazuje na obturacyjną przyczynę azoospermii. Obniżone stężenie całkowitej zawartości fruktozy w plazmie nasienia (norma:  $\geq 13$   $\mu\text{mol}$ /ejakulat) występowało w przypadku 12 pacjentów (11,9%). Obniżenie całkowitego stężenia kwasu cytrynowego (norma:  $\geq 52$   $\mu\text{mol}$ /ejakulat) stwierdzono u 32 pacjentów (31,7%).

Porównano wyniki badań nasienia przeprowadzone u pacjentów o prawidłowej i obniżonej ruchliwości progresywnej plemników. Stwierdzono statystycznie istotne obniżenie objętości ejakulatu





Rycina 3. Ocena korelacji pomiędzy ruchem postępowym plemników a koncentracją (A) i całkowitą liczbą plemników (B), odsetkiem plemników z prawidłową żywotnością (C), odsetkiem plemników z prawidłową morfologią (D) objętością ejakulatu (E) całkowitą zawartością fruktozy w ejakulacie (F). Współczynnik R-Spearmana;  $p < 0,05$

u pacjentów z astenozoospermia (ryc. 1A), nie stwierdzono natomiast różnic w pH nasienia między badanymi grupami.

Wykazano statystycznie istotnie niższą całkowitą liczbę plemników w ejakulacie oraz niższy odsetek żywotnych plemników w grupie AST w porównaniu do K (ryc. 1B, 1C). Nie wykazano natomiast różnic w pozostałych parametrach nasienia.

Wykazano znamienne niższe stężenia fruktozy (ryc. 2A) i kwasu cytrynowego (ryc. 2B) w całym ejakulacie u mężczyzn z grupy AST. Nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności NAG w badanych grupach.

Wykonano analizę korelacji pomiędzy odsetkiem plemników wykazujących ruch postępowy a pozostałymi badanymi parametrami nasienia. Wykazano znamienne statystycznie dodatnie, słabe korelacje z: objętością ejakulatu, koncentracją i całkowitą liczbą plemników i prawidłową morfologią, a także silną zależność z żywotnością plemników (ryc. 3 A-E). Znamienne statystycznie dodatnie lecz słabe korelacje wykazano także pomiędzy odsetkiem plemników z ruchem postępowym a całkowitą zawartością fruktozy w ejakulacie (ryc. 3 F). Nie stwierdzono istotnych korelacji z aktywnością NAG i całkowitym stężeniem kwasu cytrynowego w plazmie nasienia.

## Dyskusja

Badania nad związkiem między ruchliwością plemników a innymi parametrami nasienia, w tym biochemicznymi markerami czynności gruczołów dodatkowych męskiego układu płciowego, były podejmowane stosunkowo rzadko, chociaż zaburzenia budowy i czynności plemników oraz nieprawidłowy skład plazmy nasienia mogą być wyrazem obecności patogennych czynników przedjądrowych, jądrowych oraz pozajądrowych wpływających na męską płodność. Oprócz podstawowego badania nasienia WHO w kolejnych podręcznikach (WHO 1992, 1999, 2010) rekomenduje także biochemiczną ocenę plazmy nasienia, jednak badania te w Polsce nie są popularne i bywają wykonywane tylko w niewielu specjalistycznych ośrodkach. W przedstawianej pracy podjęto próbę znalezienia związku między ruchliwością plemników a wybranymi makroskopowymi, mikroskopowymi oraz biochemicznymi parametrami nasienia u mężczyzn z nieplodnych par.

Obniżona ruchliwość plemników może wynikać z zaburzeń związanych z ich dojrzewaniem, ale także może być efektem ich uszkodzeń powstałych już po uzyskaniu zdolności plemników do ruchu. W grupie mężczyzn ze zmniejszoną ruchliwością plemników stwierdzono istotne zmniejszenie objętości nasienia oraz całkowitej liczby i żywotności plemników. Pogorszenie tych parametrów może wskazywać na stan zapalny w układzie moczowo-płciowym. Wykazano bowiem, iż zapalenie jąder, najądrzy, a także gruczołu krokowego wiąże się z mniejszą objętością ejakulatu oraz obecnością oligoastenozoospermii, która może być efektem szkodliwego wpływu reaktywnych form tlenu produkowanych w dużych ilościach przez leukocyty [14-16]. Stan zapalny mogą powodować infekcje bakteryjne, których toksyny mogą mieć wpływ na czynność plemników [17-20]. Ponadto w prezentowanej pracy wykazano dodatnie, słabe korelacje pomiędzy odsetkiem plemników z ruchem postępowym a liczbą ( $R=0,32$ ) i koncentracją plemników ( $R=0,24$ ), oraz odsetkiem

plemników żywotnych ( $R=0,72$  zależność silna) i z prawidłową budową ( $R=0,31$ ). W badaniach klinicznych i eksperymentalnych wykazano na podstawie testów czynnościowych oceniających zdolność plemników do migracji, wiązania z kwasem hialuronowym lub osłonką przejrzystą komórki jajowej, że czynność plemników jest zależna od jakości ejakulatu [21-24].

Ocena parametrów biochemicznych nasienia umożliwia ocenę funkcji narządów takich jak najądrze, pęcherzyki nasienne i gruczoł krokowy. Jednym z ocenianych w niniejszej pracy parametrów biochemicznych była aktywność NAG. Jest to enzym z grupy hydrolaz, który katalizuje hydrolizę wiązań  $\alpha$ -1,4-glikozydowych i jest syntetyzowany głównie w trzonie i ogonie najądrza [25, 26]. Ocena aktywności NAG może być przydatna w różnicowaniu azoospermii obturacyjnej od azoospermii jądrowej [27, 28]. Jeżeli w ejakulacie nie są obecne plemniki, a wartość aktywności NAG jest w normie, świadczy to o drożności dróg wyprowadzających nasienie i przyczynie azoospermii w zaburzeniu czynności jąder (azoospermia nieobturacyjna). W prezentowanej tu pracy azoospermia dotyczyła 8% pacjentów i u 67% spośród nich przyczyną nie dotyczyła zaburzeń czynności gonad, ale wynikała z niedrożności dróg wyprowadzających nasienie, na co wskazywała niska aktywność NAG.

Najądrza są narządem, gdzie plemniki uzyskują zdolność do ruchu [11]. Prawidłowa czynność tego gruczołu wydaje się więc kluczowa dla zachowania prawidłowej czynności męskich gamet. W oparciu o wyniki dotychczasowych badań nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, czy istnieje zależność między aktywnością NAG a ruchliwością plemników. Wykazano, że w nasieniu z astenozoospermia aktywność tego enzymu jest istotnie niższa w porównaniu z nasieniem o prawidłowych parametrach [29], a także wykazano pozytywną korelację między aktywnością NAG a ruchem postępowym plemników [27, 30, 31]. Ponadto zaobserwowano istotne obniżenie aktywności NAG u pacjentów, u których występowały jednocześnie żylaki powrózków nasiennych oraz oligoastenozoospermia, co mogłoby sugerować wpływ hipoksji i stresu oksydacyjnego na czynność najądrzy [32]. Istnieją jednak badania, które nie potwierdziły istotnego związku pomiędzy aktywnością NAG a ruchliwością plemników [33, 34]. Wyniki prezentowanych tu badań również nie wykazały istotnego statystycznie obniżenia aktywności NAG u pacjentów z astenozoospermia w porównaniu do pacjentów, u których odsetek plemników ruchliwych był prawidłowy. Jednakże wyniki tu prezentowane dotyczą nieplodnych mężczyzn, u których występowały także inne zaburzenia jakości nasienia. Dużą grupę stanowili mężczyźni z oligozoospermia (57%), u których ruchliwość plemników nie we wszystkich przypadkach była obniżona (19 przypadków; 32,8%). Należy jednak wziąć pod uwagę, że nawet przy prawidłowym odsetku plemników ruchliwych, ale niskiej liczbie plemników w ejakulacie, całkowita liczba plemników o prawidłowej ruchliwości jest obniżona. WHO nie podaje wprawdzie wartości referencyjnej dla takiego parametru jak całkowita liczba ruchliwych plemników, ale wydaje się istotne, by rozważyć jego znaczenie i wprowadzić do rutynowej diagnostyki. Aktywność NAG nie wykazywała korelacji z odsetkiem plemników ruchliwych w naszym badaniu, ale przyczyną tego może

być związana z obniżeniem całkowitej liczby plemników u 19 pacjentów, u których plemniki wykazywały prawidłowy ruch postępowy. W innych badaniach wykazano związek aktywności NAG z logarytmem liczby plemników w ejakulacie [34], co może potwierdzać wpływ oligozoospermii na wyniki korelacji z odsetkiem plemników ruchliwych. Rozbieżności w wynikach odnoszących się do związku NAG z ruchliwością plemników mogą wynikać również ze złożoności przyczyn tego zjawiska. Nie bez znaczenia wydają się być wyniki badań, które podkreślały, że aktywność NAG może być związana z czasem abstynencji seksualnej lub z porą roku [35, 36].

W prezentowanej pracy zbadano także związek między odsetkiem plemników o ruchu postępowym i stężeniem fruktozy w plazmie nasienia. Fruktaza to monosacharyd produkowany w pęcherzykach nasiennych, których wydzielina stanowi około 50-60% ejakulatu [37]. Wydaje się być głównym źródłem energii wykorzystywanym w procesie fruktolizy zachodzącym zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych w nasieniu ssaków, w tym również ludzi [38]. Wykazano statystycznie mniejsze stężenie fruktozy w ejakulatach mężczyzn z astenozoospermia w porównaniu do mężczyzn z prawidłowym odsetkiem plemników z ruchem postępowym, a ponadto wykazano istotną statystycznie dodatnią, słabą korelację ( $R=0,31$ ) między tymi parametrami. Jednak jak wynika z innych publikacji związek między stężeniem fruktozy w plazmie nasienia a ruchem plemników jest niejednoznaczny. W pracy Patel i wsp. wykazali istnienie dodatniej korelacji między stężeniem fruktozy a odsetkiem ruchliwych plemników [39]. W innym badaniu chociaż nie wykazano podobnej korelacji to stwierdzono znamienne różnicę pomiędzy stężeniem fruktozy u mężczyzn z astenozoospermia oraz astenoteratozoospermia w porównaniu do mężczyzn z normozoospermia [33]. Wykazano tu, że stężenie fruktozy jest znamienne obniżone przy izolowanej astenozoospermii, natomiast podwyższone w przypadku występowania zaburzeń ruchu i morfologii plemników. Autorzy sugerują, że plemniki wykazujące defekty w budowie wykazują niskie zużycie substancji energetycznej, jaką jest fruktoza. Są jednak prace, w których nie wykazano żadnej zależności pomiędzy ilością fruktozy w plazmie nasienia a jakością ejakulatu [27]. Wpływ czynności pęcherzyków nasiennych na jakość nasienia jest trudny do oceny także dlatego, że zależy od wielu innych czynników m.in. poziomu androgenów, czy czasu abstynencji seksualnej, ale jego znaczenie nie powinno być bagatelizowane.

W prezentowanej pracy badano również zależność między odsetkiem plemników o ruchu postępowym a stężeniem kwasu cytrynowego w plazmie nasienia. Kwas cytrynowy jest wskaźnikiem czynności gruczołu krokowego. Dotychczasowe badania naukowe wskazywały na zależność pomiędzy czynnością prostaty ocenianą na podstawie różnych markerów (Zn, PSA, PAP,  $\beta$ -NSP) wydzielanych przez ten gruczoł [40, 41]. Chociaż część autorów wykazała brak takiej zależności w przypadku użycia jako markera kwasu cytrynowego [27]. W prezentowanym tu badaniu wykazaliśmy, że całkowite stężenie kwasu cytrynowego w nasieniu mężczyzn o obniżonej ruchliwości plemników było niższe niż u tych z prawidłową ruchliwością postępową. Może to wskazywać, że wydzielina gruczołu krokowego ma wpływ na ruchliwość plemni-

ków. Zawartość kwasu cytrynowego jest czynnikiem obniżającym pH nasienia. Nie wykazano znamienych różnic przy ocenie tego parametru w badanych grupach.

W prezentowanej pracy wykazano związek odsetka plemników z ruchem postępowym a objętością ejakulatu, jednego z parametrów makroskopowych nasienia. Wyniki wskazały na istotnie niższe wartości objętości ejakulatu u pacjentów z astenozoospermia, a ponadto istotną statystycznie, dodatnią słabą korelację między objętością nasienia a odsetkiem plemników z ruchem postępowym ( $R=0,32$ ). Obniżona objętość nasienia może wskazywać na zaburzenie czynności gruczołów dodatkowych, zwłaszcza pęcherzyków nasiennych i gruczołu krokowego, które są odpowiedzialne za wytwarzanie 95% objętości ejakulatu. Przyczyny obniżenia objętości nasienia mogą się wiązać z infekcjami i stanem zapalnym w układzie moczowo-płciowym, częściową niedrożnością dróg wyprowadzających nasienie i/lub przewodów odprowadzających wydzielinę z gruczołów dodatkowych, czy obniżonym poziomem testosteronu, a więc czynnikami, które mogą mieć również wpływ na ruchliwość plemników [42, 43].

### Wnioski

Astenozoospermia może się wiązać z nieprawidłowymi parametrami makroskopowymi i mikroskopowymi nasienia, takimi jak obniżona objętość ejakulatu, obniżona liczebność plemników oraz zmniejszony odsetek plemników żywych i o prawidłowej morfologii, a także z obniżonym stężeniem parametrów biochemicznych nasienia. Współwystępowanie nieprawidłowych parametrów makroskopowych, mikroskopowych i biochemicznych nasienia, może wskazywać na wspólny czynnik etiologiczny tych zaburzeń. Biorąc pod uwagę różne możliwe przyczyny astenozoospermii oraz występowanie towarzyszących jej zaburzeń należy podkreślić znaczenie wykonywania badań dodatkowych w nasieniu, które zwiększają szansę na znalezienie przyczyny zaburzeń męskiej płodności.

### Podziękowania

Praca sponsorowana z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503/1-089-03/503-01 oraz Grantu dla młodego naukowca 502-03/1089-03/502-14-176.

### Piśmiennictwo

1. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002; 77(5): 873-882.
2. Beauchamp PJ, Galle PC, Blasco L. Human sperm velocity and postinsemination cervical mucus test in the evaluation of the infertile couple. *Arch Androl* 1984; 13(2-3): 107-112.
3. Munire M, Shimizu Y, Sakata Y, et al. Impaired hyperactivation of human sperm in patients with infertility. *J Med Dent Sci* 2004; 51(1): 99-104.
4. Sullivan R, Mieusset R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update* 2016; 22(5): 574-587.
5. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth ed. 2010.
6. Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl* 2003; 49(5): 343-349.
7. Ambulkar PS, Waghmare JE, Chaudhari AR, et al. Large Scale 7436-bp Deletions in Human Sperm Mitochondrial DNA with Spermatozoa Dysfunction and Male Infertility. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(11): GC09-GC12.

8. Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003; 9(5): 405-428.
9. Linck RW, Chemes H, Albertini DF. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(2): 141-156.
10. Baccetti B, Capitani S, Collodel G, et al. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum Reprod* 2001; 16(7): 1365-1371.
11. Cooper TG. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl* 2007; 9(4): 533-539.
12. Robaire B, Hamzeh M. Androgen action in the epididymis. *J Androl* 2011; 32(6): 592-599.
13. Pajovic B, Dimitrovski A, Radojevic N, et al. Comparison of Sperm Parameters in Patients with Infertility Induced by Genital Infection versus Varicocele. *Balkan Med J* 2015; 32(3): 255-259.
14. Wang A, Fanning L, Anderson DJ, et al. Generation of reactive oxygen species by leukocytes and sperm following exposure to urogenital tract infection. *Arch Androl* 1997; 39(1): 11-17.
15. Fraczek M, Kurpisz M. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl* 2007; 28(2): 325-333.
16. Walczak-Jedrejowska R. Stres oksydacyjny a niepłodność męska. *Postępy Andrologii Online* 2015; 2(1): 5-15.
17. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, et al. Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 140(1): 3-11.
18. Prabha V, Chaudhary N, Kaur S. Molecular mimicry between spermatozoa and bacteria. *J Urol* 2011; 186(6): 2442-2447.
19. Fraczek M, Hryhorowicz M, Gill K, et al. The effect of bacteriospermia and leukocytospermia on conventional and nonconventional semen parameters in healthy young normozoospermic males. *J Reprod Immunol* 2016; 118: 18-27.
20. Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. *J Reprod Immunol* 2005; 67(1-2): 51-56.
21. Cayli S, Jakab A, Ovari L, et al. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(4): 462-468.
22. Ghosh I, Bharadwaj A, Datta K. Reduction in the level of hyaluronan binding protein 1 (HABP1) is associated with loss of sperm motility. *J Reprod Immunol* 2002; 53(1-2): 45-54.
23. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 3: 1616-1624.
24. Hall JL. Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1981; 35(4): 457-463.
25. Cooper TG. Secretory proteins from the epididymis and their clinical relevance. *Andrologia* 1990; 22 Suppl 1: 155-165.
26. Yeung CH, Cooper TG, Senge T. Histochemical localization and quantification of alpha-glucosidase in the epididymis of men and laboratory animals. *Biol Reprod* 1990; 42(4): 669-676.
27. Zopfgen A, Priem F, Sudhoff F, et al. Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Hum Reprod* 2000; 15(4): 840-845.
28. Oszukowska E, Walczak-Jedrejowska R, Marchlewska K i wsp. Niedrożność dróg wyrowadzających plemniki jako przyczyna niepłodności u mężczyzn. *Postępy Andrologii Online* 2016; 3(2): 6-15.
29. Said L, Saad A, Carreau S. Differential expression of mRNA aromatase in ejaculated spermatozoa from infertile men in relation to either asthenozoospermia or teratozoospermia. *Andrologia* 2014; 46(2): 136-46.
30. Viljoen MH, Bornman MS, van der Merwe MP, et al. Alpha-glucosidase activity and sperm motility. *Andrologia* 1990; 22(3): 205-208.
31. Fourie MH, du Toit D, Bornman MS, et al. alpha-Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. *Arch Androl* 1991; 26(3): 139-141.
32. Roaiah MM, Mostafa T, Salem D, et al. alpha-1,4-Glucosidase activity in infertile oligoasthenozoospermic men with and without varicocele. *Andrologia* 2007; 39(1): 28-32.
33. Said L, Galeraud-Denis I, Carreau S, et al. Relationship between semen quality and seminal plasma components: alpha-glucosidase, fructose and citrate in infertile men compared with a normospermic population of Tunisian men. *Andrologia* 2009; 41(3): 150-156.
34. Krause W, Bohring C. Why do we determine alpha-glucosidase activity in human semen during infertility work-up? *Andrologia* 1999; 31(5): 289-294.
35. Elzanaty S, Malm J, Giwercman A. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. *Hum Reprod* 2005; 20(1): 221-225.
36. Henkel R, Maass G, Schuppe HC, et al. Seasonal changes of neutral alpha-glucosidase activity in human semen. *J Androl* 2006; 27(1): 34-39.
37. Gonzales GF. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J Androl* 2001; 3(4): 251-258.
38. Mann T, Jones R, Sherins RJ. Fructolysis in Human Spermatozoa Under Normal and Pathological Conditions. *J Androl* 1980; 1(5): 229-233.
39. Patel SM, Skandhan KP, Mehta YB. Seminal plasma fructose and glucose in normal and pathological conditions. *Acta Eur Fertil* 1988; 19(6): 329-332.
40. Ahlgren G, Rannevik G, Lilja H. Impaired secretory function of the prostate in men with oligo-asthenozoospermia. *J Androl* 1995; 16(6): 491-498.
41. Carpino A, Sisci D, Aquila S, et al. Adnexal gland secretion markers in unexplained asthenozoospermia. *Arch Androl* 1994; 32(1): 37-43.
42. Lopez-Hurtado M, Velazco-Fernandez M, Pedraza-Sanchez MJE, et al. Molecular detection of Chlamydia trachomatis and semen quality of sexual partners of infertile women. *Andrologia* 2017.
43. Luttmer R, Dijkstra MG, Snijders PJ, et al. Presence of human papillomavirus in semen in relation to semen quality. *Hum Reprod* 2016; 31(2): 280-286.

#### Autor do korespondencji:

dr n. med. Katarzyna Marchlewska  
 Zakład Endokrynologii Płodności  
 Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności  
 91-425 Łódź, ul. S. Sterlinga 5  
 tel. +48 42 6330705  
 e-mail: katarzyna.marchlewska@umed.lodz.pl

Otrzymano: 16.05.2017

Akceptacja do druku: 18.07.2017

Konflikt interesów: nie zgłoszono