

## **Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress**

**Int J Andrology 2010; 33:013-021; DOI:10.1111/j.1365-2605.2008.00941.x**

OZLEM TUNC (1,2), JEREMY THOMPSON (1) AND KELTON TREMELLEN (1,2)

(1) Research Centre for Reproductive Health, Discipline of Obstetrics and Gynaecology, School of Paediatrics and Reproductive Health, University of Adelaide, Adelaide, and (2) Repromed, Dulwich, South Australia, Australia

Correspondence to: Kelton Tremellen, Repromed, 180 Fullarton Road, Dulwich, South Australia 5065, Australia. E-mail: [kelton.tremellen@adelaide.edu.au](mailto:kelton.tremellen@adelaide.edu.au)

Oxidative stress is a well-established cause of male infertility, with reactive oxygen species (ROS) causing infertility principally by impairing sperm motility and DNA integrity. Currently, most clinics do not test their infertile patients for the presence of oxidative stress because the available tests are expensive or difficult to perform. As antioxidant therapy may improve sperm DNA integrity and pregnancy outcomes, it has become apparent that there is an unmet clinical need for an inexpensive and easy-to-perform assay to identify sperm oxidative stress. The aim of this study was to develop a standardized protocol for performing a photometric nitro blue tetrazolium (NBT) assay for the measurement of seminal ROS production via production of coloured formazan, whilst correlating these results with impaired sperm function (motility and DNA integrity). Semen samples from 21 fertile and 36 male aetiology infertile men were assessed for ROS production (NBT assay), sperm DNA integrity (TUNEL), apoptosis (Annexin V) and sperm motility. Infertile men's semen contained on average fourfold higher levels of ROS than fertile men. The production of ROS by sperm was positively correlated with sperm DNA fragmentation and apoptosis, whilst being negatively correlated with sperm motility. Receiver-operating characteristic plot analysis established a cut-off point of 24 µg formazan/10<sup>7</sup> sperm/ml having a sensitivity of 91.7% and a specificity of 81% for determining the fertility status of an individual. This study has been successful in establishing a standardized protocol for performing a photometric seminal NBT assay that has significant clinical utility in identifying men with impaired fertility because of oxidative stress.

### **Lo sviluppo del test NBT quale marcatore dello stress ossidativo degli spermatozoi**

Lo stress ossidativo è una condizione ben definita quale causa dell'infertilità maschile, dove le specie reattive dell'ossigeno (ROS) producono l'infertilità principalmente alterando la motilità degli spermatozoi e integrità del DNA. Attualmente molti clinici non testano i loro pazienti infertili per la presenza dello stress ossidativo poiché i test disponibili sono dispendiosi o difficili da eseguire. Poiché la terapia antiossidante può migliorare l'integrità del DNA spermatico e l'induzione della gravidanza, è ben evidente come vi sia una inespresa necessità clinica di avere un esame a basso costo e semplice da eseguire per identificare lo stress ossidativo. Lo scopo di questo studio fu di sviluppare un protocollo standardizzato per eseguire l'esame fotometrico con nitro-blu di tetrazolio (NBT) così da misurare la produzione dei ROS seminali tramite la produzione del colorante formazan, correlando quindi questi risultati con l'alterazione della funzione spermatica (motilità e integrità del DNA). Furono preparati i campioni di sperma di 21 uomini fertili e di 36 uomini infertili per testare la produzione dei ROS (NBT test), l'integrità del DNA degli spermatozoi (TUNEL), l'apoptosi (Annexina V) e la motilità degli spermatozoi. Lo sperma degli uomini infertili conteneva in media livelli di ROS quattro volte maggiori rispetto agli uomini fertili. La produzione dei ROS da parte degli spermatozoi era correlata positivamente con la frammentazione del DNA e con l'apoptosi, mentre era negativamente correlata con la motilità degli spermatozoi. L'analisi grafica per punti dei dati raccolti permise di stabilire il punto di separazione per la determinazione dello stato di fertilità di un individuo a 24 µg di formazan/10<sup>7</sup> spermatozoi/ml con una sensibilità del 91.7% e una specificità del 81%. Lo studio si è dimostrato efficace nello stabilire il protocollo standardizzato per l'esecuzione del test fotometrico spermatico con NBT dimostrando la significativa utilità clinica nella identificazione degli uomini con alterata fertilità indotta da stress ossidativo.

**Il commento** - La proposta di questo test, tecnicamente già noto per la determinazione di altri parametri, per determinare lo stato ossidativo degli spermatozoi dà ai clinici una semplice e buona possibilità di migliorare enormemente e con semplicità una condizione di alterazione degli spermatozoi e quindi di poter mirare meglio e monitorare efficacemente i percorsi terapeutici nei casi abbastanza frequenti di disfertilità e di infertilità. Il test, rispetto ad altri disponibili, è molto semplice, richiede pochi mezzi spesso già in possesso di un normale laboratorio, è decisamente rapido e di costo abbastanza contenuto: complessivamente circa 60 minuti per un dato veramente fondamentale. Gli autori lo hanno ben validato dimostrando la elevata correlazione tra i parametri della alterazione degli spermatozoi derivante spessissimo dallo stato ossidante e l'aumento della presenza del reattivo colorato (il formazan) e definendo il livello di separazione del reattivo tra la condizione di alterazione della fertilità (da danno al DNA e da danno alla mobilità per iperossidazione) e la condizione di fertilità o comunque di disfertilità non derivante da stati iperossidanti. Ora resta solo che

tale test, che viene denominato NBT test dal nome della molecola impiegata per la reazione, possa diffondersi nei laboratori e/o presso gli andrologi come strumento della metodologia base nella valutazione dello stato della fertilità.