

# Uloga oksidacijskog stresa u etiologiji muške neplodnosti

---

**Gašparović, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:991129>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Marija Gašparović

ULOGA OKSIDACIJSKOG STRESA U ETIOLOGIJI MUŠKE NEPLODNOSTI

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

STUDIJ MEDICINA

Marija Gašparović

ULOGA OKSIDACIJSKOG STRESA U ETIOLOGIJI MUŠKE NEPLODNOSTI

Diplomski rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Romano Oguić, dr.med

Diplomski rad ocjenjen je dana 29.6.2023. u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv.prof.dr.sc. Josip Španjol, dr.med.
2. izv.prof.dr.sc. Dean Markić, dr.med.
3. nasl.doc.dr.sc. Antun Gršković, dr.med.

Rad sadrži 30 stranica i 19 literaturnih navoda.

## Zahvale

Zahvaljujem svome mentoru izv.prof.dr.sc. Romanu Oguiću na stručnoj pomoći i savjetima pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je omogućila da studiram ono što želim.

Zahvaljujem svojim prijateljima koji mi nisu dali da odustanem.

Zahvaljujem svom dečku koji je činio teške trenutke lakšima.

# Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	SVRHA RADA	3
3.	PREGLED LITERATURE NA ZADANU TEMU	4
3.1.	ANATOMIJA MUŠKOG REPRODUKTIVNOG SUSTAVA	4
3.2.	FIZIOLOŠKA ULOGA MUŠKOG REPRODUKTIVNOG SUSTAVA	5
3.3.	OPLODNJA	7
3.4.	OKSIDACIJSKI STRES	8
3.5.	SPERMIOGRAM	9
3.6.	FIZIOLOŠKA ULOGA ROS-A	11
3.7.	PATOLOŠKI UČINCI	13
3.8.	VARIKOCELA	14
3.9.	EKSTRINZIČNI IZVORI OKSIDACIJSKOG STRESA	15
3.10.	ANTIOKSIDANSI U SJEMENOJ TEKUĆINI	17
4.	RASPRAVA	20
5.	ZAKLJUČCI	22
6.	SAŽETAK	23
7.	SUMMARY	25
8.	LITERATURA	27
9.	ŽIVOTOPIS	30

Popis skraćenica i akronima:

X – X kromosom

Y – Y kromosom

n – broj kromosoma, haploidan

2n – broj kromosoma, diploidan

GnRH – gonadotropin oslobađajući hormon, eng. *gonadotropin-releasing hormone*

FSH – folikulostimulirajući hormon, eng. *follicle-stimulating hormone*

LH – luteinizirajući hormon, eng. *luteinizing hormone*

ROS – reaktivni kisikovi spojevi, eng. *reactive oxygen species*

$\cdot\text{O}_2^-$  - superoksidni radikal

$\cdot\text{OH}$  – hidroksilni radikal

$\cdot\text{O}_2\text{H}$  – perhidroksilni radikal

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

MAR test – test protuspermalnih protutijela, eng. *mixed antiglobulin reaction test*

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

pH – mjera kiselosti odnosno lužnatosti vodenih medija, lat. *potentia hydrogenii*

mL – mililitar

$\cdot\text{NO}$  – dušikov oksid

ONOO<sup>-</sup> - peroksinitrit

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

PKA – protein kinaza A

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

SOD – superoksid dismutaza

IL-8 – interleukin 8

MDA – malonaldehid

ATP – adenzin trifosfat

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, eng. *deoxyribonucleic acid*

HSP – proteini toplinskog stresa, eng. *heat shock proteins*



## 1. Uvod

Neplodnost je nemogućnost postizanja trudnoće nakon godine dana nezaštićenih spolnih odnosa. Zahvaća 10-15% parova, a muškarac je uzrok u oko 30% slučajeva. U 15% neplodnih parova uzrok je nepoznat, u oko 35% uzrok je žena, a u 20% su uzrok i žena i muškarac. Prema jednoj od podjela uzroka muške neplodnosti razlikujemo pretestikularne, testikularne i posttestikularne uzroke. (1) Kompleksnost oksidacijskog stresa u kontekstu životnih navika, kroničnih i infektivnih bolesti te okolišnih čimbenika utječe na molekularna zbivanja u muškom reproduktivnom sustavu. (2) Pretestikularni uzroci su brojni, a uključuju bolesti i stanja koja remete rad osovine hipotalamus-hipofiza. Testikularni su uzroci povezani s promjenama u testisu, a uključuju različite kromosomopatije, kriptorhizam, varikocelu, infekcije, kemoterapiju, uzimanje lijekova, izlaganje zračenju, toplini i teškim metalima. U posttestikularne uzroke ubrajamo opstrukcije odvodnih kanala, poremećaj funkcije spermija, poremećaje ejakulacije i erekcijsku disfunkciju. U dijagnostičkoj obradi neplodnog para važna je detaljna anamneza u kojoj liječnik ispituje o sistemskim bolestima, kongenitalnim bolestima, zahvatima u abdomenu, zdjelici i ingvinalnoj regiji, transuretralnim zahvatima, uzimanju lijekova i kroničnom izlaganju ionskom zračenju, duhanskom dimu i visokoj temperaturi. Seksualna anamneza uključuje podatke o učestalosti spolnih odnosa, planiranju, kvaliteti erekcije, korištenja kontracepcije i lubrikanata te podatke o prijašnjim trudnoćama s istim ili drugim partnerom. U fizikalnom pregledu potrebno je obratiti pažnju na razvoj sekundarnih muških spolnih karakteristika, na fizikalni status genitalnih organa kao i na palpatorni nalaz prostate. Od laboratorijskih nalaza je potrebno napraviti kompletnu krvnu sliku, urin, urinokulturu i analizu ejakulata. (1) U gotovo pola slučajeva muške neplodnosti pojavljuje se oksidativni stres. To je stanje u kojemu dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva koji u manjim količinama sudjeluju u nekim

fiziološkim procesima, međutim u velikim količinama narušavaju morfologiju spermija i oštećuju njihovu DNA. (2)

## 2. Svrha rada

Svrha ovoga rada je približiti kompleksnost molekularnih zbivanja u muškom reproduktivnom sustavu u situacijama u kojima dolazi do oksidacijskog stresa. Kontrolirana proizvodnja reaktivnih kisikovih spojeva ima ključnu ulogu u procesima sazrijevanja spermija i same oplodnje, međutim pretjerana proizvodnja dovodi do oksidacijskog stresa koji ima negativne učinke na plodnost. U ovome radu se oksidacijski stres stavlja u kontekst životnih navika, kroničnih i infektivnih bolesti te okolišnih čimbenika.

### 3. Pregled literature na zadanu temu

#### 3.1. Anatomija muškog reproduktivnog sustava

Testis je parna spolna žlijezda smještena u skrotumu elipsoidnog oblika. Na svojoj površini ima čvrstu vezivnu ovojniciu, tuniku albugineu, koja u dubinu pruža vezivne pregrade koje dijele testis na režnjice. Svaki režnjic se sastoji od 1-4 zavijenih sjemenih kanalića. Kanalići su izgrađeni od zametnog epitela u kojemu se odvija spermatogeneza. U vezivu između sjemenih kanalića se nalaze intersticijske Leydigove stanice koje proizvode testosteron. Zavnuti sjemeni kanalići se spajaju i tvore ravne kanaliće koji čine mrežu kanalića iz koje se izdvajaju odvodni kanalići koji izlaze kroz gornji kraj testisa i sudjeluju u izgradnji epididimisa. Epididimis je izgrađen od jako zavijenih i sklopčanih odvodnih kanalića testisa koji se spajaju u jedan kanal nazvan ductus epididimis. Glava epididimisa čini njegov najširi dio i prekriva gornji dio testisa, a na nju se nadovezuju trup i rep koji se spuštaju stražnjim rubom testisa do njegovog donjeg kraja. Epididimis se nastavlja u duktus deferens, odnosno sjemenovod. To je cijevasti organ duljine oko 50cm koji se pruža od epididimisa do prostate. Razlikujemo 4 dijela: pars epididimica, pars funicularis, pars inguinalis i pars pelvina. Na svojem završnom dijelu je vretenasto proširen u ampulu ductus deferentis. U prostati se spaja s kanalom sjemenog mjehurića i nastaje ductus ejakulatorius koji prolazi stražnjim dijelom baze prostate i otvara se u uretru. Sjemeni mjehurić je parna žlijezda koja se nalazi između mokraćnog mjehura i rektuma lateralno od ampule ductus deferentis. On izlučuje alkalični sekret koji ulazi u sastav sperme. Njegov se odvodni kanalić spaja sa sjemenovodom. Prostata je žlijezdani organ koji se nalazi ispod mokraćnog mjehura, a obavlja početni dio mokraćne cijevi. Njezina je baza okrenuta prema mokraćnom mjehuru a vrh prema dijafragmi urogenitale. Na stražnjoj strani baze ulaze ductus ejakulatorii. Prostata je

podijeljena na dva režnja, lobus dexter i lobus sinister. Dio između uretre i dva duktusa ejakulatoriusa je lobus medius. Vanjske spolne organe čine penis i skrotum. Penis je svojim stražnjim dijelom, radix penis, pričvršćen za zdjelicu. Njegov srednji dio se naziva corpus, a vrh glans penis. Glans prekriva duplikatura kože, praeputium. Osnovu penisa čine desni i lijevi corpus cavernosum penis i neparni corpus spongiosum penis. Kavernoza tijela su izgrađena od šupljine koje su obložene endotelom, glatkom muskulaturom i vezivom. Međusobno povezane te šupljine čine labirint koji se tijekom erekcije ispunjava krvlju. Kroz corpus spongiosum se pruža mokraćna cijev koja se otvara na glansu. Mošnja je kožna vreća koja visi između bedara ispred perineuma i podijeljena je vezivnom pregradom na lijevu desnu polovicu. U svakoj je uloženi testis, epididimis i dio funikulusa spermatikusa. Mokraćna cijev u muškaraca ima dvojaku ulogu, pražnjenje mokraćnog mjehura i odvod sperme. Podijeljena je u tri dijela. Pars prostatica je početni dio koji prolazi kroz prostatu, pars membranacea srednji dio koji prolazi kroz dijafragmu urogenitale i pars spongiosa završni dio koji prolazi kroz corpus spongiosum. U početnom dijelu spongioznog dijela mokraćne cijevi se ulijeva parna glandula bulbourethralis. (3)

### 3.2. Fiziološka uloga muškog reproduktivnog sustava

Reprodukcijaska funkcija muškarca započinje procesom spermatogeneze. To je proces nastajanja zrelih spermija iz primitivnih zametnih stanica, spermatogonija. Odvija se u sjemenim kanalicima u testisu. Sjemeni kanalić izgrađen je od tri sloja: vezivne ovojnice, bazalne lamine i zametnog epitela koji se sastoji od potpornih Sertolijevih stanica i stanica spermatogenetske loze.

Spermatogonije tijekom svoje diferencijacije putuju od bazalne lamine kroz Sertolijeve stanice prema lumenu sjemenih kanalića. Razlikujemo spermatogonije tipa A od spermatogonija tipa B.

Spermatogonije tipa A se klonskim diobama dijele dalje u spermatogonije, a iz spermatogonija tipa B nastaju stanice koje ulaze u daljnju diferencijaciju. Spermatogonije tipa B se diferenciraju

u primarne spermatocite koje sadržavaju 46 ( $44 + XY; 4n$ ) kromosoma. Primarne spermatocite ulaze u prvu mejotičku diobu te nastaju sekundarne spermatocite koje imaju 23 kromosoma ( $22 + X$  ili  $22 + Y; 2n$ ). Iz sekundarnih spermatocita drugom mejotičkom diobom nastaju spermatide koje sadrže 23 kromosoma ( $22 + X$  ili  $22 + Y; n$ ). Navedene stanice koje nastaju iz jedne spermatogonije tipa B nisu međusobno potpuno razdvojene već su spojene međustaničnim citoplazmatskim mostićima koji imaju važnu ulogu u izmjeni informacija i usklađivanju slijeda događaja u spermatogenezi. Kada se završi proces spermatogeneze spermiji odbacuju svoju citoplazmu i citoplazmu mostića u obliku rezidualnih citoplazmatskih tjelešaca. Spermatide ulaze u proces spermiogeneze kako bi poprimile građu i funkciju zrelog spermija. Spermiogeneza se sastoji od četiri faze. Prva je Golgijeva faza u kojoj iz Golgijeva aparata nastaje akrosomski mjehurić nasuprot kojega se pomiču centrioli iz kojih će nastati rep spermija. Druga je akrosomska faza u kojoj se formira akrosom koji prekriva prednji dio jezgre. U trećoj fazi centrioli rastu tvoreći rep. Na proksimalnom dijelu repa dolazi do nakupljanja mitohondrija koji čine zadebljanje repa koje je odgovorno za pokretljivost spermija. Završna faza, odnosno maturacija, je faza dozrijevanja kada dolazi do odbacivanja suvišne citoplazme i otpuštanja zrelog spermija u lumen sjemenog kanalića. (4)

Nakon spermiogeneze spermiji putuju u epididimis gdje bivaju pohranjeni. U epididimisu spermiji stječu sposobnost pokretanja, ali inhibicijske bjelančevine ih ograničavaju kako bi ostali pohranjeni do ejakulacije. Nakon ejakulacije spermiji sazrijevaju i postižu svoju konačnu pokretljivost. Uz spermije iz epididimisa se u ejakulacijski kanal izlučuje hranjiva tekućina koja sadrži hormone, enzime i hranjive tvari. Nakon toga sjemeni mjehurići izlučuju svoj sekret koji sadrži hranjive tvari, prostaglandine i fibrinogen, a iz prostate se izlučuje lužnati sekret koji

poboljšava pokretljivost spermija. Tako nastaje sjemena tekućina koja se tijekom spolnog čina ejakulira i dostiže u ženski reproduktivni sustav. (5)

Spermatogeneza se odvija pod kontrolom hormona koji se izlučuju u hipotalamusu, hipofizi i testisima. Hipotalamus izlučuje GnRH u portalni krvotok hipofize i taj hormon djeluje na stanice prednjeg režnja hipofize. GnRH se izlučuje pulsatilno i na taj način potiče stvaranje receptora za GnRH u stanicama hipofize. Stanice prednjeg režnja hipofize izlučuju u perifernu cirkulaciju FSH i LH koji dolaze testisa i u njemu djeluju na stanice u spolnim kanalićima. FSH djeluje na Sertolijeve stanice i spermatogonije potičući spermatogenezu, a LH djeluje na intersticijske Leydigove stanice koje izlučuju testosteron. Testosteron putem negativne povratne sprege na hipofizu i hipotalamus regulira vlastitu proizvodnju. (1)

### 3.3. Oplodnja

Oplodnja je spajanje spermija i oocite (ženske spolne stanice). Odvija se u ampularnom dijelu jajovoda, gdje spermiji dolaze vlastitim pokretanjem i gibanjem tekućine koju pokreću trepetljike epitela jajovoda. Jajna stanica na svojoj površini ima glikoproteinsku ovojnici koja se naziva zona pelucida i skupinu granulosa stanica koje potječu iz kumulusa ooforusa koji je prekrivao jajnu stanicu u folikulu prije ovulacije. Granuloza stanice koje su nanizane oko zone pelucide čine koronu radijatu. Spermiji koji dostižu u ženski spolni sustav moraju proći proces kapacitacije u kojem dolazi do uklanjanja glikoproteinskog omotača s akrosomskog dijela spermija i proteina sjemenske tekućine. Samo kapacitirani spermiji mogu proći kroz koronu radijatu, a samo jedan spermij dostiže do zone pelucide i ulazi u akrosomsku reakciju. Tijekom akrosomske reakcije dolazi do oslobađanja akrosomskih enzima koji omogućuju prodiranje spermija kroz zonu pelucidu do stanične membrane oocite. Kada glava spermija dođe u kontakt s površinom oocite dolazi do kortikalne reakcije u kojoj oocita oslobađa lizosomske enzime koji

djeluju na njezinu staničnu membranu i zonu pelucidu koje postaju nepropusne za druge spermije. Na taj način se sprječava polispermija. Kada spermij uđe u oocitu njegova jezgra bubri i nastaje muški pronukleus, a rep se odbacuje. Približavanjem muškog i ženskog pronukleusa nestaju njihove jezgrine ovojnice i spajaju se. (6)

### 3.4. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je stanje u kojemu je ravnoteža oksidacijsko-redukcijskih reakcija pomaknuta prema reakcijama oksidacije. U takvim uvjetima nastaju reaktivni kisikovi spojevi (ROS), iznimno reaktivne molekule koje posjeduju jedan nespareni elektron zbog čega su nestabilne. ROS teže stabilizaciji te reagiraju s molekulama u njihovoj neposrednoj okolini i uzrokuju oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida. Takva oštećenja mogu dovesti do mutacija, karcinoma, autoimunih bolesti i ateroskleroze. Najreaktivniji slobodni radikali koji imaju najveći učinak na tkiva su superoksidni radikal ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) i perhidroksilni radikal ( $\cdot\text{O}_2\text{H}$ ). Slobodni kisikovi radikali potječu iz reakcija oksidacijskog metabolizma koji se odvija u mitohondrijima svake stanice te staničnog odgovora na ksenobiotike, citokine i bakterijsku invaziju. Neki od izvora slobodnih kisikovih radikala u ljudskom organizmu su ionizirajuće zračenje, neenzimske reakcije prijelaznih metala, respiracijski prasak aktiviranih makrofaga te fiziološka oksidacija reduciranih flavinskih koenzima. Ionizirajuće zračenje uzrokuje lizu vode i stvaranje hidroksilnih radikala. Prijelazni metali u reakciji s kisikom ili vodikovim peroksidom također mogu dovesti do stvaranja hidroksilnih radikala. Dušikov monoksid također može sudjelovati u reakcijama oslobađanja hidroksilnog radikala. Oksidacijski prasak aktiviranih makrofaga je reakcija koja služi uništavanju fagocitiranih mikroorganizama u kojoj nastaje superoksidni radikal. U respiracijskom lancu tijekom aerobnog metabolizma u mitohondrijima oksidacija flavinskih koenzima rezultira stvaranjem slobodnih kisikovih radikala.



Antioksidansi su molekule koje neutraliziraju slobodne kisikove radikale i štite stanice od oksidacijskog stresa. Podijeljene su u tri glavne skupine: enzimi, vitamini i polifenoli. U peroksisomima se nalaze enzimi koji sudjeluju u uklanjanju superoksidnog radikala, superoksid-dismutaze, katalaza i peroksidaze. Glutation-peroksidaza je enzim koji reducira lipidne perokside nastale djelovanjem radikala na staničnu membranu i lipoproteine plazme te sam ostaje oksidiran. Tako oksidirani glutacion dalje reducira enzim NADPH-glutacion-reduktaza. Vitamini E i C također međusobnom interakcijom sudjeluju u reduciranju lipidnih peroksida stvarajući askorbat i dehidroaskorbat. Askorbat također ima antioksidativno djelovanje. Mokraćna kiselina i polifenoli dobiveni iz hrane predstavljaju vodotopljive antioksidanse, a ubikinon i beta-karoten antioksidanse topljive u lipidima. (7)

### 3.5. Spermogram

Jedan od prvih dijagnostičkih postupaka u obradi neplodnosti je spermogram. To je laboratorijska metoda analize ejakulata kojom se mogu otkriti poremećaji broja, oblika i pokretljivosti spermija. Uzorak za analizu, ejakulat, se daje 3-4 dana po apstinenciji. Nakon ejakulacije ejakulat je u obliku koaguluma koji u roku od 30 minuta podliježe procesu likvefakcije u kojemu prelazi u homogenu tekuću smjesu i takav postaje pogodan za analizu. Potpuna odsutnost ejakulata pri ejakulaciji se naziva aspermija. Prema smjernicama SZO, analiza ejakulata se sastoji od bazičnog, proširenog te naprednog pregleda. Bazična analiza uključuje mjerenje volumena ejakulata, procjenu likvefakcije, viskoznosti i makroskopskog izgleda, mjerenje pH, određivanje broja spermija, mikroskopsku analizu morfološkog izgleda, aglutinacije, pokretljivosti, koncentracije i vitalnosti spermija, određivanje prisutnosti leukocita te MAR test. Viskoznost se određuje ispuštanjem uzorka iz pipete. Izgled se ocjenjuje temeljem boje i homogenosti uzorka. Normalan je uzorak homogena smjesa prozirno bijele boje. Volumen

je veoma važan parametar jer niski volumen upućuje na opstrukciju sjemenovoda, a visoki na različite upale spolnih organa. pH je bitni pokazatelj lučenja sjemene tekućine iz sjemenih mjehurića i prostate. Normalni uzorci sperme imaju  $\text{pH} > 7.0$ . Mikroskopski se određuje aglutinacija, motilitet, vitalnost, broj, koncentracija i morfologija spermija. Aglutinacija spermija je patološki znak i podijeljena je u stupnjeve ovisno o broju spermija sljepljenih u aglutinatu. Pokretljivost spermija se ocjenjuje kao progresivno pokretni, neprogresivno pokretni i nepokretni spermiji. Određuje se i broj ukupno pokretnih spermija koji uključuje progresivno pokretne i neprogresivno pokretne, koji se izražava u postotku, a referentni interval iznosi 40-43%. Manje od 40% pokretljivih spermija se naziva astenozoospermija. Vitalnost se izražava kao postotak živih spermatozoida u uzorku, a referentni interval iznosi 50-56%. Broj spermija je gruba procjena koja se dobije brojanjem spermija u nativnom preparatu na srednjem povećanju mikroskopa. Referentni interval je  $35\text{-}40 \times 10^6$ . Odsutnost spermija u ejakulatu koja se može uočiti prilikom mikroskopskog pregleda se naziva azoospermija. Koncentracija je broj spermija u jedinici volumena, a određuje se pomoću Maklerove komorice. Normalna je koncentracija iznad  $2 \times 10^6/\text{mL}$ . Smanjena koncentracija spermija ( $< 2 \times 10^6/\text{mL}$ ) se naziva oligozoospermija. Pomoću komorice se određuje i broj okruglih stanica koje predstavljaju leukocite i nezrele spolne stanice, a njihova je prisutnost patološki znak. Leukocitospermija se definira kao  $> 1 \times 10^6/\text{mL}$  leukocita u ejakulatu. Kod pregleda morfologije spermija obraća se pozornost na oblik i veličinu glave, vrata i repa te njihov međusobni odnos. Normalan spermij ima ovalnu glavu s konusnim završetkom, vrat koji se postepeno sužava i rep ravnih kontura. Poremećaje morfologije spermija jednim imenom nazivamo teratozoospermija. Prisutnost mrtvih spermija se naziva nekrozoospermija. Proširena analiza ejakulata uključuje mjerenje fragmentacije DNA, genetičke i genomske testove te različite imunološke i biokemijske testove. Napredna analiza uključuje test

na oksidacijski stres, procjenu akrosomske reakcije i kromatina te analizu transmembranskog toka iona. (1,8,9)

### 3.6. Fiziološka uloga ROS-a

Iako velika količine slobodnih radikala štetno djeluju na stanice u svim stadijima spermatogeneze i spermioogeneze, u malim količinama igraju veoma važnu fiziološku ulogu. Superoksidni radikal, vodikov peroksid, dušikov oksid ( $\cdot\text{NO}$ ) i peroksinitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ ) sudjeluju u procesu kapacitacije spermija koji se odvija u ženskom spolnom sustavu. Prilikom njihovog putovanja jajovodom do mjesta oplodnje spermiji počinju proizvoditi povećanu količinu slobodnih kisikovih radikala. Kontrolirana proizvodnja slobodnih kisikovih radikala, prvenstveno superoksidnog radikala, potiče adenilil ciklazu na proizvodnju cAMP-a te dolazi do aktivacije enzima protein kinaze A (PKA). Posljedično dolazi do polimerizacije aktina koji je ključan za pojačanu pokretljivost spermija. Ovaj proces stjecanja povećane pokretljivosti spermija se zove hiperaktivacija. Samo takvi spermiji mogu ući u akrosomsku reakciju, odnosno prijeći koronu radijatu koja okružuje oocitu i prionuti uz zonu pelucidu. Otkriveno je da ljudski spermiji generiraju reaktivne kisikove radikale pomoću nekoliko različitih mehanizama. NADPH oksidaza smještena na staničnoj membrani i mitohondrijska oksidoreduktaza ovisna o NADH sudjeluju u proizvodnji superoksidnog radikala. Enzim superoksid dismutaza (SOD) taj radikal pretvara u vodikov peroksid. Dušikov oksid sintetaza proizvodi dušikov oksid te on u reakciji sa superoksidnim radikalom tvori peroksinitrit koji služi kao potentan oksidans koji potiče oksidaciju kolesterola u staničnoj membrani. Oksiteroli nastali oksidacijom kolesterola napuštaju staničnu membranu i čine je fluidnijom što omogućava fuziju spermija i oocite. (10)

U ejakulatu se, osim stanica spermatogenetske loze, mogu naći i leukociti. Leukociti igraju važnu ulogu u obrani od infekcija, ali su i važan izvor reaktivnih kisikovih spojeva. Većinski udio čine

peroksidaza pozitivni polimorfonukleari i makrofagi. Veliki dio ovih leukocita potječe iz prostate i sjemenih mjehurića. Prisutnost proinflammatoryh citokina kao što je IL-8 i smanjena aktivnost antioksidacijskih enzima kao što je SOD dovesti će do respiracijskog praska i aktivacije leukocita. Aktivirani leukociti proizvode reaktivne kisikove radikale 100 puta više nego neaktivirani leukociti, zbog čega su infekcije važan uzrok oksidacijskog stresa. Kako bi ostvarili svoju pokretljivost, spermijima je potrebna velika količina energije, a tu energiju proizvode prvenstveno aerobnim metabolizmom koji se odvija u mitohondrijima. Zbog toga sadrže veliki broj mitohondrija u svom srednjem dijelu. Upravo su mitohondriji primarno mjesto proizvodnje slobodnih kisikovih radikala u spermijima. Reaktivni kisikovi radikali nastaju kao nusprodukt respiracijskog lanca i upravo zato je jedan od glavnih razloga nastajanja oksidacijskog stresa u spermijima njihov ekstenzivan aerobni metabolizam. (11,12)

Tijekom sazrijevanja stanice spermatogenetske loze spontano proizvode slobodne kisikove radikale. Spermatogeneza je metabolički veoma aktivan proces tijekom kojeg superoksidni radikal nastaje kao nusprodukt staničnog disanja. Pokazalo se da najveće količine reaktivnih kisikovih radikala proizvode nezrele stanice, a najmanje zreli spermiji. Također spermiji defektne morfologije proizvode više reaktivnih kisikovih radikala od spermija normalne morfologije. Od te skupine najviše reaktivnih kisikovih radikala proizvode spermiji s promijenjenom morfologijom glave i s rezidualnim citoplazmatskim tjelešcima. Sertolijeve stanice štite stanice spermatogenetske loze od oksidacijskog stresa sve do trenutka kada se zreli spermiji izbace u sjemeni kanalčić. Tada spermiji postaju veoma osjetljivi na oksidacijski stres jer više nisu prisutni zaštitni mehanizmi Sertolijevih stanica, a sami posjeduju veoma ograničene mehanizme obrane od oksidacijskog stresa. (11,13)

### 3.7. Patološki učinci

Stanična membrana stanica spermatogenetske loze sadrži velike količine polinezasićenih masnih kiselina, koje su nestabilne i veoma podložne djelovanju slobodnih kisikovih radikala. Te polinezasićene masne kiseline igraju važnu ulogu u regulaciji spermatogeneze i omogućuju fluidnost membrane. U uvjetima oksidacijskog stresa će slobodni radikali pokrenuti kaskadu kemijskih reakcija koje jednim imenom nazivamo lipidnom peroksidacijom. Ta će kaskada rezultirati gubitkom polinezasićenih masnih kiselina iz membrane, smanjenom fluidnošću membrane, povećanom propusnošću membrane za ione i inaktivacijom membranskih receptora i enzima. Lipidna peroksidacija se odvija u tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija. U inicijaciji reaktivni kisikovi spojevi reagiraju s masnim kiselinama i nastaju lipidni radikali i voda. Tijekom propagacije nastali lipidni radikal dalje reagira s kisikom i nastaje peroksilni radikal. Taj peroksilni radikal reagira dalje s nezasićenim masnim kiselinama i nastaju novi lipidni radikali koji će dalje reagirati s kisikom i nastati će lipidni peroksid. Tako dolazi do začaranog kruga u kojemu novonastali lipidni radikali uzrokuju daljnje stvaranje lipidnih radikala. Radikali reagiraju s nereaktivnim molekulama u ovoj samopropagirajućoj reakciji sve dok razina slobodnih radikala ne postane dovoljno visoka da radikali krenu reagirati međusobno tvoreći nereaktivni završni produkt malondialdehid (MDA). Tako dolazi do terminacije lipidne peroksidacije. Uz MDA lipidnom peroksidacijom nastaju i nusprodukti akrolein i 4-hidroksinonenal. To su citotoksični aldehidi koji se vežu za proteine transportnog lanca elektrona u mitohondriju i potiču stvaranje reaktivnih kisikovih radikala i tako nastaje još jedan začarani krug u kojemu reaktivni kisikovi spojevi uzrokuju peroksidaciju i obrnuto. To također može uzrokovati poremećaje u proizvodnji ATP-a i posljedično oštećenja aksoneme, morfološke defekte srednjeg dijela spermija, smanjenu pokretljivost i vijek spermija. (12)

DNA u spermija je organizirana nešto drugačije nego u ostalih vrsta stanica. Kromatin se nalazi u jezgri u obliku nukleosoma koji je pomoću histona zavijen u obliku zavojnice. Tijekom spermatogeneze dolazi do strukturalnih modifikacija u kojima se, u procesu protaminacije, histoni zamjenjuju protaminima. To su proteini koji omogućuju još veću kondenzaciju kromatina. Takav je kromatin otporan na oksidacijski stres i DNA oštećenja. Međutim ukoliko dođe do pogrešaka u ovom procesu i nepotpune kondenzacije, DNA ostaje osjetljiva na djelovanje oksidacijskog stresa i dolazi do "frame-shift" mutacija, delecija, crosslink mutacija i dispozicije kromosoma. Jednostruki lomovi DNA su direktna posljedica oksidativnog oštećenja, a dvostruki lomovi posljedica izloženosti 4-hidroksinonenalu, važnom produktu lipidne peroksidacije. Osim za neplodnost, oštećenja DNA su važan faktor u etiologiji ponavljanih spontanih pobačaja i morbiditeta ploda. (12)

ROS mogu narušiti integritet membrane mitohondrija što dovodi do oslobađanja citokroma C koji aktivira apoptotičke kaspaze. Apoptoza je programirana smrt stanica koja služi uklanjanju genetički defektnih stanica. To je fiziološki mehanizam kontrole kvalitete stanica spermatogenetske loze u testisu, međutim što više stanica ulazi u apoptozu to je veći učinak na količinu spermija u ejakulatu. Na taj način apoptoza može utjecati na plodnost muškarca. (14)

### 3.8. Varikocela

Varikocela je jedan od najvažnijih uzroka neplodnosti u muškaraca. Ona nastaje zbog zastoja krvi u venama pampiniformnog pleksusa u funikulusu spermatikusu. Zastoj dovodi do venskog refleksa i širenja samih vena te povišenja temperature testisa što ima negativan učinak na spermatogenezu. Lijevostrana varikocela je češća od desnostrane zbog utoka unutarnje spermatične vene u lijevu renalnu venu pod pravim kutem što uzrokuje veći tlak u samoj veni. Varikocela su podijeljene u tri stupnja. Stupanj I je najblaži oblik varikocela kada je ona

palpabilna samo prilikom Valsalvinog pokusa. Stupanj II označava srednje veliku varikocelu koja je palpabilna i bez Valsalvinog pokusa, ali nije vidljiva. Stupanj III je velika varikocela vidljiva kroz kožu skrotuma. Varikocela dovodi do oksidacijskog stresa jer dovodi do toplinskog stresa, hipoksije i upalnih promjena u testisu. Optimalna temperatura za odvijanje spermatogeneze je za 2.5 stupnjeva Celzijusa niža od središnje tjelesne temperature. Pacijenti s varikocelom imaju u prosjeku 1.5 stupnjeva Celzijusa višu skrotalnu temperaturu nego zdravi muškarci. Heat shock proteini (HSP) su skupina proteina koji se aktiviraju u odgovoru na toplinski stres, a sudjeluju u regulaciji transkripcije, translacije i prijenosa signala. Neadekvatna proizvodnja HSP-a u spermijima bi mogla objasniti povećanu denaturaciju proteina, apoptozu i neplodnost u pacijenata s varikocelom. U pacijenata s varikocelom je izmjerena manja aktivnost HSPA2 koja se povećala nakon resekcije varikocele. Osim toga povišena temperatura dovodi do povećanog metabolizma u stanicama uslijed čega dolazi do proizvodnje ROS-a. Toplinski stres također dovodi i do proizvodnje reaktivnih dušikovih radikala koji lako difundiraju kroz membranu spermija i reagiraju sa superoksidnim radikalom tvoreći peroksinitrit i peroksinitritnu kiselinu. Hipoksija narušava aktivnost proteina koji sudjeluju u transportnom lancu elektrona staničnog metabolizma i na taj način pridonosi oksidacijskom stresu. Također su otkriveni mehanizmi koji, interakcijom upalnih citokina i ROS-a, dovode do neplodnosti. (1,15)

### 3.9. Ekstrinzični izvori oksidacijskog stresa

Brojni su okolišni čimbenici, životne navike, bolesti i stanja koja mogu dovesti do oksidacijskog stresa u muškom spolnom sustavu. Infekcije urogenitalnog trakta u muškaraca imaju negativan učinak na plodnost. Invazija mikroorganizama uzrokuje aktivaciju polimorfonuklearnih leukocita i posljedično dolazi do povećane proizvodnje ROS-a i oksidacijskog stresa. Do 50% muškaraca oboli od prostatitisa barem jednom u svom životu. Bakterije koje uzrokuju prostatitis potječu iz

urotrakta ili spadaju u spolno prenosive uzročnike. Od bakterija koje nisu spolno prenosive najčešći su uzročnici streptokoki (*S. viridans* i *S. pyogenes*), koagulaza negativni stafilocoki (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*), gram negativne bakterije (*E. coli*, *Proteus mirabilis*) i atipične bakterije (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*), a od spolno prenosivih je najčešća *Chlamydia trachomatis*. Od virusnih infekcija s neplodnošću uzrokovanom oksidacijskim stresom se povezuje infekcija HSV (Herpes simplex virus). (2)

Pretilost uzrokuje proizvodnju ROS-a i disreguliranu sintezu adipocitokina što pridonosi oksidativnom stresu i smanjenoj kvaliteti ejakulata. Osim toga, povećano masno tkivo u preponama može povisiti skrotalnu temperaturu i dovesti do smanjenja plodnosti mehanizmima sličnim onima u varikoceli. (11)

Dijabetes negativno utječe na plodnost muškaraca jer djeluje na spermatogenezu i erektilnu funkciju. Oksidativni stres je prepoznat kao mehanizam nastajanja mnogih kroničnih komplikacija dijabetesa. U dijabetičara su pronađene povećana proizvodnja ROS-a i smanjene razine antioksidansa. Oksidativni stres koji se pojavljuje u hiperglikemiji je posljedica proizvodnje superoksida u mitohondrijima. Otkrivena je veća razina fragmentacije DNA u dijabetičara nego u zdravih muškaraca. (11)

Povećani unos alkohola se povezuje sa smanjenim postotkom normalnih spermatozoida u muškaraca s astenozoospermijom. Nusprodukt metabolizma etanola, acetaldehid, reagira s proteinima i lipidima u stanicama spermatogenetske loze i u tim interakcijama nastaju ROS. Također u alkoholičara reproduktivne dobi su izmjerene smanjene razine antioksidansa, povećane razine ROS-a i smanjene razine testosterona u testisima. (12)



Pušenje uzrokuje disbalans između proizvodnje ROS-a i količine antioksidansa i smanjenu kvalitetu sjemena. Pušenje povećava koncentraciju leukocita u sjemenu za 48% i proizvodnju ROS-a za 107%. Pušači također imaju smanjeni antioksidativni kapacitet jer se pokazalo da pušenje smanjuje razine vitamina E i C. (12)

Zračenje koje emitiraju mobilni uređaji se pokazalo štetnim za DNA spermija. Ftalati koji se nalaze u plastičnim proizvodima koji se koriste u domaćinstvu i industriji imaju štetne učinke na spermatogenezu i DNA spermija. (12)

Zanimljivo je da oksidacijski stres mogu uzrokovati upravo tehnike potpomognute oplodnje. Prilikom in vitro fertilizacije i intrauterine inseminacije se koristi centrifugiranje kako bi se odvojili spermiji od sjemene tekućine. Taj proces potiče stvaranje oksidacijskog stresa i gubitak antioksidansa. Krioprezervacija spermija se također povezuje s povećanom razinom oksidacijskog stresa. U liječenju malignih bolesti često se koriste lijekovi i postupci koji imaju štetno djelovanje na cijeli organizam pa tako i na reproduktivni sustav. Kemoterapeutici kao što su cisplatina, doksorubicin i ciklofosfamid se povezuju s povećanim količinama oksidacijskog stresa. Radioterapija se također povezuje s oksidacijskim stresom. (2)

### 3.10. Antioksidansi u sjemenoj tekućini

Sjemena tekućina je bogata antioksidansima koji pružaju nutritivnu i zaštitnu potporu spermijima. Razlikujemo dva oblika antioksidansa, enzimatske i neenzimatske. Enzimatski uključuju glutathion peroksidazu, superoksid peroksidazu i katalazu. To su endogeni enzimi koji se normalno pojavljuju u sjemenoj tekućini i spermijima, a potječu iz prostate. Neenzimatski antioksidansi su brojni, a komponente za njihovu sintezu se dobivaju hranom. Neki primjeri neenzimatskih antioksidansa su glutathion, vitamin E, vitamin C, karotenoidi, koenzim Q10 te

neki mikronutrijenti kao što su selen i cink. Superpksid dismutaza je glavni enzim koji katalizira neutralizaciju superoksidnog radikala. Otkriveno je nekoliko izoenzima koji se nalaze intracelularno i ekstracelularno, a potječu iz prostate. Katalaza je enzim koji razlaže vodikov peroksid na vodu i molekularni kisik. Djeluje intracelularno u ljudskim spermijima. Glutation peroksidaza je glavni enzim koji neutralizira produkte lipidne peroksidacije. Ona u svom središtu sadrži selen i djeluje primarno u mitohondrijima. Također je prisutna i u jezgri gdje igra važnu protektivnu ulogu tijekom kondenzacije kromatina. Brojna su istraživanja pokazala pozitivan učinak terapije antioksidansima na parametre spermioograma. Najviše testirani su  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), askorbinska kiselina (vitamin C), L-karnitin, N-acetilcistein, cink i selen. Količina vitamina E u ejakulatu je direktno povezana s postotkom pokretljivih spermija. U neplodnih muškaraca su pronađene niske razine vitamina E. Vitamin C u oralnoj primjeni smanjuje razinu fragmentacije DNA u ejakulatu u muškaraca s normozoospermijom i astenozoospermijom. Otkriveni su i pozitivni učinci na broj spermija, pokretljivost i morfologiju kod suplementacije vitaminom C u dozi od 2000mg/dan. L-karnitin ima važnu antioksidacijsku ulogu u epididimisu, a kao suplement može povećati koncentraciju i pokretljivost spermija. N-acetilcistein je prekursor glutationa. Terapija N-acetilcisteinom može povećati broj pokretljivih spermija i smanjiti broj morfološki abnormalnih spermija s oštećenom DNA. Cink čuva strukturu spermija i u muškaraca s astenozoospermijom reducira oksidativni stres, apoptozu i fragmentaciju DNA. Selen je važan za normalnu spermatogenezu, pokretljivost i funkciju spermija. Sastavni je dio enzima glutation peroksidaze koji štiti od oksidacijskog stresa. Pokazalo se da selen pojačava pozitivan učinak vitamina E na pokretljivost spermija kada se uzimaju u kombinaciji. Osim u obliku dodataka prehrani, antioksidanse možemo dobiti pravilnom i uravnoteženom prehranom. Izvori vitamina C su citrusno voće kao što su kivi i mango, te od povrća brokula, rajčica i paprika. Vitamin E se nalazi u orašastim plodovima, biljnim uljima, morskim plodovima, siru i jajima. Cink se može

naći u orašastim plodovima, mahunarkama, morskim plodovima, žitaricama i u životinjskim proizvodima kao što su meso, riba, jogurt i mlijeko. Izvori selena su riba, češnjak i brokula.

(17,18)

## 4. Rasprava

Oksidacijski stres je stanje koje se krije iza mnogih bolesti, pa tako i neplodnosti. (2) Do oksidacijskog stresa dolazi kada je narušena ravnoteža između proizvodnje ROS-a i aktivnosti antioksidansa. (7) Tada dolazi do oštećenja stanica spermatogenetske loze na molekularnoj razini koja se klinički manifestiraju promijenjenim parametrima spermograma. Stanice spermatogenetske loze su izrazito osjetljive na djelovanje ROS-a. U svojoj membrani posjeduju velike količine polinezasićenih masnih kiselina i to ih čini podložnima lipidnoj peroksidaciji. Lipidna peroksidacija je samopropagirajući proces koji jednom kad započne potiče kaskadu reakcija u kojima se stvaraju ROS, a ROS potiču daljnju lipidnu peroksidaciju. Otkriveno je da najveće količine ROS-a proizvode nezrele stanice spermatogenetske loze i peroksidaza pozitivni leukociti. Tijekom njihovog sazrijevanja stanice spermatogenetske loze zaštićene su od oksidacijskog stresa protektivnim mehanizmima Sertolijevih stanica. Kada se nakon završene spermatogeneze i spermogeneze spermiji izbacuju u sjemeni kanalić oni postaju posebno osjetljivi na oksidacijski stres jer više nisu prisutni zaštitni mehanizmi Sertolijevih stanica. ROS mogu direktno oštetiti stanične komponente spermija ili poticanjem lipidne peroksidacije u kojoj nastaju štetni nusprodukti kao što su MDA, akrolein i 4-hidroksinonenal. Ovi procesi dovode do poremećaja pokretljivosti spermija, koncentracije i njihove morfologije. (12) Varikocela je jedan od najučestalijih uzroka muške neplodnosti koja u svojoj pozadini ima oksidacijski stres. Povećana skrotalna temperatura i hipoksija dovode do povećanja metabolizma i oštećenja proteina koji sudjeluju u transportnom lancu elektrona te posljedično do oksidacijskog stresa. (15) Infekcije kao što je prostatitis dovode do stvaranja oksidacijskog stresa jer dolazi do aktivacije leukocita koji proizvode ROS. (2) Pretilost uzrokuje sistemni upalni odgovor i otpuštanje porinflatornih citokina koji aktiviraju leukocite i potiču ih na stvaranje ROS-a.

Dijabetes negativno utječe na spermatogenezu i erektilnu funkciju i također se povezuje s oksidacijskim stresom. (11) Zlouporaba alkohola također dovodi do oksidacijskog stresa jer toksični nusprodukti njegovog metabolizma reagiraju s lipidima i proteinima u spermijima i potiču stvaranje ROS-a. Pušenje povećava količinu leukocita i ROS-a u sjemenu te smanjuje količinu antioksidansa. Od okolišnih se čimbenika izdvajaju ftalati koji se mogu naći u plastičnim proizvodima u domaćinstvu te izlaganje zračenju. (12) Antioksidansi su spojevi koji štite od oksidacijskog stresa. U spermi nalazimo enzimatske i neenzimatske antioksidanse. Enzimatski su endogenog porijekla i stalno su prisutni u spermijima, a neenzimatski su razni i dobivaju se egzogeno, iz hrane. Brojna su istraživanja pokazala pozitivan učinak terapije antioksidansima na plodnost. Primjeri antioksidansa koje možemo dobiti iz hrane su vitamin C, vitamin E, cink i selen. (17,18) Istraživanja koja ispituju pojedine antioksidanse i njihov utjecaj na plodnost ipak imaju ograničen značaj jer antioksidanse rijetko unosimo u izoliranom obliku već u sklopu prehrane gdje oni djeluju u sinergiji s drugim komponentama hrane. Osim toga teško je predvidjeti bioraspoloživost antioksidansa koje uzimamo hranom i zbog toga je teško odrediti doze koje bi se koristile u terapiji. (19) Budući da je neplodnost kompleksan problem potreban je multidisciplinarni pristup. Kontrola tjelesne težine, prestanak pušenja, ograničavanje unosa alkohola i kontroliranje hiperglikemije u dijabetičara trebali bi se savjetovati parovima koji se liječe od neplodnosti. Također treba imati na umu važnost pravilne i uravnotežene prehrane kojom dobivamo antioksidanse.

## 5. Zaključci

Etiologija muške neplodnosti je kompleksna, a iza različitih bolesti i stanja koja uzrokuju neplodnost se krije jedan zajednički mehanizam: oksidacijski stres. Ravnoteža između količine reaktivnih kisikovih spojeva i aktivnosti antioksidansa preduvjet je za normalnu spermatogenezu i oplodnju. Male količine ROS-a sudjeluju u bitnim procesima kao što su kapacitacija spermija, fuzija spermija i oocite te protaminacija spermijske DNA. Međutim u situacijama kada je proizvodnja ROS-a povećana, dolazi do oksidacijskog stresa i oštećenja stanica spermatogenetske loze, što se manifestira smanjenom koncentracijom, pokretljivošću i poremećenom morfologijom spermija. Infekcije, dijabetes, pretilost, pušenje, zlouporaba alkohola te kemoterapija i radioterapija se povezuju s poremećenom funkcijom spermija uzrokovanom oksidacijskim stresom. Pacijentima je potrebno ukazati na to da njihove životne navike, liječenje kroničnih bolesti i kontrola tjelesne težine mogu imati utjecaja na poboljšanje plodnosti.

## 6. Sažetak

Neplodnost je javnozdravstveni problem koji zahvaća 10-15% parova. U 30% slučajeva uzrok je muškarac. Etiologije muške neplodnosti su brojne, a u podlozi mnogih se krije oksidacijski stres. Oksidacijski stres je stanje narušene oksido-redukcijske ravnoteže u kojemu dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), reaktivnih molekula koje posjeduju nesporeni elektron. U svojoj težnji za stabilizacijom ROS reagiraju s molekulama u njihovoj neposrednoj blizini i oštećuju ih. U stanicama spermatogenetske loze se stvara iznenađujuća količina ROS-a. Razlog tome je što ROS imaju nekoliko fizioloških uloga. Sudjeluju u kapacitaciji spermija, omogućavaju njihovu hiperaktivaciju i sudjeluju u fuziji spermija i oocite. Velik udio ROS-a se stvara kao nusprodukt aerobnog metabolizma, a dio nastaje u peroksidaza pozitivnim leukocitima. Štetni učinci oksidacijskog stresa na spermije su lipidna peroksidacija, fragmentacija DNA i apoptoza. Varikocela je jedna od najčešćih etiologija muške neplodnosti u kojoj istovremeno djeluju temperatura, hipoksija i upala u nastajanju oksidacijskog stresa. Povezanost neplodnosti i oksidacijskog stresa pronađena je u različitim bolestima u stanja kao što su infekcije, dijabetes, alkoholizam i pretilost. Životne navike kao što je pušenje te izloženost zračenju i ftalatima koji se mogu naći u plastici se također povezuju s oksidacijskim stresom. Oksidacijski stres se može izazvati i ijtrogeno u korištenju tehnika potpomognute oplodnje i krioprezervacijom. U liječenju malignih bolesti radioterapija i kemoterapija mogu dovesti do oksidacijskog stresa i neplodnosti. Glavna crta obrane protiv oksidacijskog stresa su antioksidansi koji neutraliziraju ROS. Razlikujemo enzimatske od neenzimatskih. Enzimatski uključuju superoksid dismutazu (SOD), katalazu i glutation peroksidazu, a nalaze se u spermijima i sjemennoj tekućini. Neenzimatske antioksidanse ljudi dobivaju iz hrane, a neki primjeri su vitamin E, vitamin C, cink i selen. Nedostatak antioksidansa zbog nekvalitetne i neraznolike prehrane

također može dovesti do oksidacijskog stresa zbog čega je pravilna i uravnotežena prehrana važan faktor u plodnosti.

Ključne riječi: oksidacijski stres, reaktivni kisikovi spojevi, varikocela, antioksidansi



## 7. Summary

Infertility is a public health issue that 10-15% of couples suffer from. In 30% of the cases the causative factor is male. There are numerous etiologies of male infertility and oxidative stress plays a role in a lot of them. Oxidative stress is a state in which the oxido-reductive homeostasis is impaired and that leads to production of reactive oxygen species (ROS), reactive molecules that contain an unpaired electron. ROS have a tendency towards stability and react with the surrounding molecules while damaging them. A surprising amount of ROS are produced in the spermatozoa. This is because ROS have a few physiological roles. They play an important role in sperm capacitation, hyperactivation and fusion of the sperm with the oocyte. A large portion of ROS is produced as a byproduct of aerobic metabolism, and some come from peroxidase-positive leukocytes. Harmful effects of oxidative stress on spermatozoa include lipid peroxidation, DNA fragmentation and apoptosis. Varicocele is one of the most prevalent etiology of male infertility and it has been linked with oxidative stress due to temperature, hypoxia and inflammation. A link between oxidative stress and infertility has been found in various diseases and conditions such as infection, diabetes, alcoholism and obesity. Lifestyle factors such as smoking and environmental factors such as radiation and exposure to phthalates found in plastic are also linked to oxidative stress. Oxidative stress can also occur iatrogenically, during the use of assisted reproductive technologies and cryopreservation of sperm. Malignancy treatment in form of chemotherapy and radiotherapy can lead to oxidative stress and infertility. First line of defense against oxidative stress are antioxidants that neutralise ROS. There are enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Enzymatic are superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase and they are present in sperm cells and seminal fluid. Non-enzymatic can be obtained from food, some of which are vitamin E, vitamin C, zinc and selenium. Antioxidant deficiency due to poor diet can also lead to

oxidative stress and infertility which is why a healthy and balanced diet is a great factor in fertility.

Key words: oxidative stress, reactive oxygen species, varicocele, antioxidants

## 8. Literatura

1. Gršković A, Dimec D. Sterilitet. U: Fučkar Ž, Španjol J i sur. Urologija II. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2013; str. 271-287.
2. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. Hum Reprod Update. [Internet] 2008. [pristupljeno 19.06.2023.];14(3):243–58. Dostupno na: <https://academic.oup.com/humupd/article/14/3/243/683505>
3. Križan Z. Kompendij anatomije čovjeka. 3. izd. 3. dio, Pregled građe grudi, trbuha, zdjelice, noge i ruke: za studente opće medicine i stomatologije. Zagreb: Školska knjiga; 1997.
4. Luiz Carlos Junqueira, José Carneiro. Osnove histologije - udžbenik i atlas prema desetome američkom izdanju. Zagreb: Školska knjiga, 2006.
5. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 14. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2022.
6. T.W. Sadler. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga, 2008.
7. Robert K. Murray. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada, 2011.
8. Jedrejčić K, Banković Radovanović P, Honović L. SPERMIOGRAM – PRIKAZ NOVIH SMJERNICA WHO I PROMJENE U IZRADI. Glasnik pulske bolnice [Internet]. 2013 [pristupljeno 19.06.2023.];10(10):26-29. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/130677>
9. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, sixth edition. Geneva: World Health Organization; 2021. [pristupljeno 19.06.2023.] Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

10. Fatima S. Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction [Internet]. Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress. InTech; 2018. [pristupljeno 19.06.2023.]  
Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74763>
11. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. Int J Reprod Biomed. [Internet]. 2016. [pristupljeno 19.06.2023.];14(4):231–40. Dostupno na:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918773/>
12. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. World J Mens Health. [Internet] 2014. [pristupljeno 19.06.2023.];32(1):1. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026229/>
13. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod. [Internet] 2001. [pristupljeno 19.06.2023.];16(9):1922–30. Dostupno na:  
<https://academic.oup.com/humrep/article/16/9/1922/2915893?login=false&fbclid=IwAR1WlQjq3RI0k4IVcOL2DegzyTikZ2ewZlytenkDiQ4YXllKDY0avlmzLqQ>
14. Asadi A, Ghahremani R, Abdolmaleki A, Rajaei F. Role of sperm apoptosis and oxidative stress in male infertility: A narrative review. Int J Reprod Biomed. [Internet] 2021. [pristupljeno 19.06.2023.]; Dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8350854/>
15. Wang K, Gao Y, Wang C, Liang M, Liao Y, Hu K. Role of Oxidative Stress in Varicocele. Front Genet. [Internet] 2022. [pristupljeno 19.06.2023.];13. Dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8984266/>

16. Alahmar A. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *J Hum Reprod Sci.* [Internet] 2019. [pristupljeno 19.06.2023.];12(1):4. Dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6472207/>
17. Kowalczyk A. The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. *Reprod Sci.* [Internet] 2021. [pristupljeno 19.06.2023.];29(5):1387–94. Dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9005387/>
18. Walczak–Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska–Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol.* [Internet]. 2013. [pristupljeno 19.06.2023.];65:60–7. Dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3921845/>
19. Torres-Arce E, Vizmanos B, Babio N, Márquez-Sandoval F, Salas-Huetos A. Dietary Antioxidants in the Treatment of Male Infertility: Counteracting Oxidative Stress. *Biology (Basel).* [Internet] 2021. [pristupljeno 19.06.2023.];10(3):241. Dostupno na:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8003818/>

## 9. Životopis

Marija Gašparović rođena je 12.11.1996. u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu Josipa Račića te Klasičnu gimnaziju u Zagrebu. Akademske godine 2015./2016. upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Tijekom svog studiranja je pasivno sudjelovala na kongresima te volontirala na COVID odjelu tijekom COVID-19 pandemije. Aktivno se služi engleskim jezikom u govoru i pismu.