

Utjecaj oksidacijskog stresa na plodnost muških rasplodnjaka

Oxidative stress and antioxidants in male animal fertility



Aladrović, J.*, **Z. Lovrić**, **L.Vranković**, **B. Beer Ljubić**, **A. Prevendar Crnić**,
M. Lojkić, **I. Majić Balić**

Sažetak

Jedan od glavnih čimbenika loše kvalitete sjemena, a time i reproduktivne funkcije muških životinja, upravo je oksidacijski stres. To se stanje razvija bilo da se radi o povećanom stvaranju kisikovih i dušikovih reaktivnih spojeva (ROS/RNS) bilo smanjenoj mogućnosti antioksidacijske obrane zbog smanjene sinteze ili unosa antioksidacijskih spojeva kao što su vitamin E, A, C, karotenoidi i selen. Membrana spermija sisavaca bogata je višestruko nezasićenim masnim kiselinama koje su osjetljive na peroksidaciju uzrokovanu reaktivnim kisikovim spojevima. Zaštita spermija od oksidacijskog stresa od najveće je važnosti. Spermiji i sjemena plazma sadržavaju enzime superoksid-dismutazu, glutaton-peroksidazu, katalazu, paraoksonazu 1, glutation, albumine i vitamine E i C. Sjemena plazma ima veću koncentraciju antioksidansa od drugih bioloških tekućina te nadoknađuje manju razinu ovih molekula prisutnih u spermijima. Glavni izvor reaktivnih kisikovih spojeva jesu nezreli i mrtvi spermiji kao i leukociti koji kontaminiraju sjeme.

Ključne riječi: spermiji, sjemena plazma, oksidacijski stres, antioksidansi

Abstract

One of the most important factors contributing to poor quality semen and thus the reproductive functions of male animals has been reported to be oxidative stress. This condition develops due to some or all of these factors: a) increased production of oxygen derived oxidants, commonly known as ROS; b) reduced antioxidant defense because of the reduced synthesis of antioxidant molecules or c) a decreased intake of natural antioxidants, such as vitamins E, A and C, carotenoids and selenium. Mammalian spermatozoa membranes are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) and are sensitive to oxygen-induced damage mediated by lipid peroxidation. In order to maintain vital reproductive ability, a protective mechanism against oxidative stress has great importance. To protect spermatozoa from oxidative stress, both spermatozoa and seminal plasma contain the antioxidants superoxide dismutase, glutathione peroxidases, catalase, paraoxonase 1, glutathione, -tocopherol, ascorbic acid, glutathione and albumin. Seminal plasma has a higher concentration of antioxidants than any other biological fluid, which compensates for the low antioxidant capacity of the spermatozoa themselves. The main sources of ROS are immature forms and dead spermatozoa, and leukocytes in the semen.

Key words: spermatozoon, seminal plasma, oxidative stress, antioxidants

dr. sc. Jasna ALADROVIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Zavod za fiziologiju i radiobiologiju; dr. sc. Lana VRANKOVIĆ, dr. med. vet., Zavod za fiziologiju i radiobiologiju; dr. sc. Blanka BEER LJUBIĆ; dipl. ing. med. biokem., Klinika za unutarnje bolesti; dr. sc. Andrea PREVENAR CRNIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, Zavod za farmakologiju; dr. sc. Martina LOJKIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Klinika za reprodukciju i porodništvo, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; mag. med. vet. Zoran LOVRIĆ, dr. med. vet., Veterinarska ambulanta Hrvace d.o.o.; dr. sc. Ivanka MAJIĆ BALIĆ, dr. med. vet., Nova Genetik Križevci d.o.o.; e-mail: jasna.aladrovic@vef.hr

Uvod

Reproduktivni sustav muških životinja proizvodi spermije, sudjeluje u parenju te proizvodi i luči brojne hormone koji u sprezi sa živčanim sustavom reguliraju rast, spolno sazrijevanje i reproduktivnu funkciju mužjaka.

Za preživljavanje i funkciju spermija nužna je ravnoteža između prooksidacijskih i antioksidacijskih mehanizama, u protivnom se razvija oksidacijski stres. Muški reproduktivni sustav, pa tako i spermiji, izloženi su reaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima koji se sintetiziraju u mitohondrijima. Također, spermiji su izloženi kisiku prilikom prirodnog pripusta kao i prilikom polučivanja sjemena, manipulacije i pripreme sjemena za osjemenjivanje. Uvjeti u ženskim reproduktivnim organima potiču stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva u spermijima tijekom transporta do mjesta oplodnje. Svi navedeni procesi u organizmu kao i postupci *in vitro* izlažu spermije oksidacijskom stresu. Spermije štiti od oksidacijskih oštećenja velik broj antioksidacijskih molekula u sjemennoj plazmi i spermijima.

Reproduksijski sustav

Fiziologija reprodukcije muških životinja obuhvaća proizvodnju i sazrijevanje muških spolnih stanica i prenošenje spermija u ženske reproduktivne organe. Muški reproduksijski organi sastoje se od parnih muških spolnih žlijezda sjemenika (*testis, orchis*), od nuzsjemenika (*epididymis*), sjemenovoda (*ductus deferens*), mokraćnice (*urethra*), dodatnih spolnih žlijezda (*glandulae genitales accessoriae*) i muškog kopulacijskog organa (*penis*). Sjemenici stvaraju sjemenske stanice i hormone, u nuzsjemenicima spermiji sazrijevaju (Červený i sur., 2009.), a dodatne spolne žlijezde izlučuju fruktozu, limunsku kiselinu, cink, kalcij, citrate, fosfate te bjelančevine, što čini povoljan medij za preživljavanje spermija do oplodnje jajne stanice (Cergolj i Samardžija, 2006).

Reproduksijska aktivnost pod nadzorom je osi hipotalamus-hipofiza-sjemenik. Podražaji iz okoliša djeluju na središnji živčani sustav, neurotransmiterima se informacija prenosi u hipotalamus koji putem hormona koji oslobađa gonadotropine potiče hipofizu na lučenje folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Ti hormoni dovode do stvaranja i sazrijevanja spermija te sinteze i izlučivanja steroidnih hormona testosterona i estrogena nužnih za spermatogenezu i sazrijevanje spermija te oplodnu sposobnost muških rasplodnjaka (Dukes 2015.; Guyton i Hall, 2006.).

Grada spermija

Sjeme ili sperma sastoji se od staničnog dijela i sjemene plazme. Pritom spermiji čine oko 98 - 99,75 % stanica. Prosječan volumen, broj spermija, pH-vrijednost ejakulata te sastav sjemene plazme razlikuju se od vrste do vrste (tablica 1, Setchell, 2014.). U ejakulatu mogu biti prisutne i epitelne stanice, eritrociti i leukociti (Jeyendran, 2003.).

Spermiji su stanice koje se po brojnim karakteristikama razlikuju od drugih tjelesnih stanica. Specifična su izgleda, ne mogu se dijeliti ni rasti. Pokretne su zahvaljujući pokretima repa spermija te mogu preživljavati *in vivo* i *in vitro*. Nastaju u testisima, u procesu spermatogeneze, tj. stvaranja spermatozoida, a sazrijevaju u epididimisu (Kaya i sur., 2014.; Dukes, 2015.). Epididimis izlučuje tekućinu bogatu bjelančevinama i steroidima s ciljem zaštite spermija od štetnoga djelovanja slobodnih radikala i drugih kemijskih tvari.

Spermiji se sastoje iz glave, vrata i tijela te repa (slika 1). Glava spermija asimetrična je oblika, čini osnovu stanice spermija (Cergolj i Samardžija, 2006.; Setchell, 2014.). Na prednjoj je strani pokrivena akrosomom. Integritet akrosome nužan je za uspješnu oplodnju i svaka promjena propusnosti akrosomske i/ili stanične membrane dovodi do gubitka sadržaja akrosome i nesposobnosti spermija da prodre u jajnu stanicu (Parkinson, 1996.). U citoplazmi glave spermija nalazimo DNK, RNK, kromatin te enzim alkalnu fosfatazu. Glavu s repom spaja tijelo koje je pokretač spermija. U tijelu se nalaze mitohondriji, bjelančevine, lipidi, ugljikohidrati.

Sazrijevanje spermija nakon ejakulacije nastavlja se u spolnim organima ženki gdje se uklanjaju inhibicijski faktori čime spermiji postaju sposobni za oplodnju. Taj se proces naziva kapacitacija, a obilježavaju ga promjene u propusnosti akrosome, egzo-



Slika 1. Spermiji nerasta. Bojanje po Papanicolaou. 100x

Tablica 1. Sastav sjemena domaćih životinja (Setchell, 2014.).

	BIK	OVAN	JARAC	NERAST	PASTUH
Sjeme					
% suhe tvari	9,5	14,8	-	4,6	4,3
pH	6,48-6,99	5,9-7,3	-	6,85-7,9	6,2-7,8
Specifična masa	1,035	-		-	1,013
Koncentracija spermija (*10 ⁹ /mL)	3-20	20-50	10-50	0,25-3,5	0,3-8
% spermija	10	33	-	2	3
Volumen sjemena (mL)	2-10	0,5-2,0	0,5-2,5	150-500	20-300
Sjemena plazma					
Askorbinska kiselina mg/100 mL)	8,7	5,0	-	-	-
Hidrogenkarbonat (mmol/L)	7,1 ^a	7,1 ^a	-	-	-
Kalcij (mmol/L)	9,3	1,9	-	-	6,5
Klor (mmol/L)	49	18	-	96	-
Limunska kiselina (mg/100 mL)	357-1000	137	-	36-325	8-53
Fruktoza (mg/100 mL)	120-540	150-600	-	20-40	< 1
Glutaminska kiselina (mg/100 mL)	35-41	76	-	-	-
Glicerilfosforilkolin (mg/100 mL)	110-500	1600-2000	1400-1600 ^a	110-240 ^a	40-110
Inozitol (mg/100 mL)	25-46	10-15	-	380-610	19-47
Magnezij (mmol/L)	3,4	2,4	-	-	3,8
Monozidaza (U/mL)	400	50	-	-	-
Kalij (mmol/L)	44	23	-	16	26
Proteini (g/L)	30-80	-	-	-	-
Natrij (mmol/L)	117	78	-	122	114
Sorbitol (mg/100 mL)	10-136	26-120	-	6-18	20-60

^a-sjeme ukupno

citoza enzima hijaluronidaze i akrozina što se naziva akrosomska reakcija (Shadan i sur., 2004.; Setchell, 2014.). Navedeni enzimi otapaju granuloza-stanice čime je omogućen ulazak genetskog materijala u citoplazmu jajne stanice. Pri kapacitaciji dolazi do uklanjanja kolesterola (Beer Ljubić i sur., 2009.) iz membrane spermija te se mijenja fluidnost i propusnost membrane za kalcij, bikarbonate i vodikov peroksid. Određivanje koncentracije kolesterola i fosfolipida te

izračunavanje omjera tih dvaju pokazatelja važan je marker kvalitete sjemena (Beer Ljubić i sur., 2012.).

Nezreli oblici spermija imaju proksimalnu ili distalnu protoplazmatsku kapljicu (slika 2) koja se nalazi ispod glave ili na repu spermija. Takvi su nezreli oblici spermija neotporni i afertilni (Banaszewska i sur., 2015.). Upravo ti spermiji, kao i mrtvi oblici, glavni su izvor slobodnih radikala u sjemenu (Halliwell i Gutteridge, 1999.).



Slika 2. Mrtvi spermij (MS) nerasta i prisustvo protoplazmatske kape (PK) na spermiju. Bojenje eozin-nigrozina, 100x

Sastav sjemene plazme

Udio sjemene plazme u sjemenu, ovisno o životinjskoj vrsti, iznosi od 50 do 90 % (tablica 1). Sjemena plazma nastaje u akcesornim spolnim žlijezdama, posebice sjemenoj vrećici te epididimisu, manjim dijelom čini je sekret sjemenih kanalića i sjemenovoda. Sadržava elemente cink, kalcij, bakar, natrij, magnezij, kalij, mangan, fosfate, sulfate, kloride, bikarbonate, limunsku kiselinu, fruktozu, aminokiseline, enzime, prostaglandine i vitamine C, B, A, D i E (Peschi i sur., 2006.; Setchell, 2014.). Sastav sjemene plazme ovisi o funkciji reproduktivnih organa, prije svega akcesornih spolnih žlijezda, ali i o funkciji, metaboličkoj aktivnosti i integritetu stanične membrane spermija. Osobito se to odnosi na koncentraciju kalcijevih iona, budući da oni sudjeluju u procesima kapacitacije spermija i akrosomske reakcije (Witte i Schäfer-Somi, 2007.). Također, ne može se isključiti utjecaj otpuštanja kalcija, fosfata i magnezija u plazmu tijekom akrosomske reakcije i nakon smrti pojedinih spermija na koncentraciju minerala u sjemenoj plazmi. Također, sjemena plazma ima veću koncentraciju/aktivnost antioksidacijskih molekula nego druge biološke tekućine te je na taj način kompenziran niski antioksidacijski kapacitet spermija (Agarwal i sur., 2003.; Gurler i sur., 2015.).

Antioksidacijski sustav sjemena

Kako bi spermiji bili oplodno sposobni kada dospiju do jajne stanice, bilo da se radi o svježem sjemenu bilo sjemenu pripremljenom za umjetno osjemenjivanje, sjeme treba imati zaštitne mehanizme od oksidacije ROS i RNS kako ne bi došlo do oksidacijskog stresa i ugibanja prije oplodnje. U membrani,

citoplazmi i organelama spermija i sjemenoj plazmi nalazimo enzime superoksid-dismutazu, glutation-peroksidazu, glutation-reduktazu, katalazu, paraoksonazu 1 (Vaisberg i sur., 2005.; Baumber i Ball, 2005.; Perumal, 2014.). Također su prisutne i brojne neenzimske antioksidacijske molekule: glutation, piruvat, taurin, albumini, tioredoksin, vitamioni E i C (Zini i sur., 1993.; Irvine, 1996.; Raijmakers i sur., 2003.).

Antioksidansi mogu sprječavati nastanak slobodnih radikala enzimski (superoksid-dismutaza, glutation-reduktaza, katalaza, glutation-peroksidaza), neenzimski zbog svog redoks-potencijala (glutation i tioredoksin sustav), kao i vežući metale željezo i bakar (ceruloplazmin, transferin, haptoglobin, feritin, mioglobin, albumini). Antioksidacijsko djelovanje može se očitovati također u sprječavanju i ograničavanju lančane reakcije stvaranja i širenja peroksidacije, kako djeluju vitamini A, E, C, karotenoidi, ubikinoli, glutation, glutation-peroksidaza i mokraćna kiselina. Ako je oksidacijom neka molekula oštećena, moguće je obnavljanje njezinih oštećenih dijelova ili uklanjanje pomoću lipaza, peptidaza, proteaza, transferaza, enzima koji uklanjaju oštećenja DNK, ligaza, nukleaza, polimeraza, proteinaza i fosfolipaza (Surai, 2002.).

Zbog specifične građe glave, oskudne citoplazme kao i ograničene mogućnosti sinteze aktivnost antioksidacijskih enzima u spermijima vrlo je niska (Aitken i sur., 1989.), a kako su stanice bogate višestruko nezasićenim masnim kiselinama, vrlo su osjetljive na peroksidaciju. Fiziološki slabiju zaštitu samih spermija kompenziraju antioksidacijske molekule u sjemenoj plazmi (Agarwal i sur., 2003.; Kadirve i sur., 2014.).

Superoksid-dismutaza (SOD)

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) jest enzim koji katalizira reakciju razgradnje superoksidnog radikala do molekule kisika i vodikova peroksida. Stoga u fiziološkim uvjetima SOD održava koncentraciju superoksidnog radikala na razini od 10^{-10} do 10^{-11} M (Halliwell i Gutteridge, 1999.).

Kod sisavaca su izdvojena tri oblika SOD-a koji se razlikuju po metalima kofaktorima i lokalizaciji u stanici i izvanstaničnom prostoru. Superoksid-dismutaza, koja sadržava cink i bakar (bakar-cink superoksid-dismutaza, CuZnSOD), prisutna je najvećim dijelom u citoplazmi, ali je nalazimo i u lizosomima, peroksisomima, jezgri te prostoru između vanjske i unutarnje membrane mitohondrija (Halliwell i Gutteridge, 1999.). Cink stabilizira enzim i ne sudjeluje u reakciji katalize superoksidnog radikala.

Organizam životinja, osim CuZnSOD, sadržava i superoksid-dismutazu koja u aktivnom centru ima mangan - MnSOD (Halliwell i Gutteridge, 1999.). Taj ga izoenzim u mitohondrijima pri curenju superoksidnog radikala u lancu oksidacijske fosforilacije uklanja te je aktivnost MnSOD-a to veća što je broj mitohondrija u tkivu veći.

Izvanstanični SOD (EC-SOD) nalazi se u izvanstaničnoj tekućini. Sadržava četiri atoma bakra i cinka, očituje veliku SOD aktivnost, a kao i CuZnSOD, inaktivira se cijanidom. Nalazi se u tjelesnim tekućinama i izvanstaničnom matriksu tkiva (Ookawara i sur., 1998.). Visoka aktivnost ovog izoenzima utvrđena je u epididimisu (Mruk i sur., 2002.).

Kao što je spomenuto, upravo je superoksidni radikal potreban za kapacitaciju i akrosomsku reakciju u malim količinama, a ako se proizvodi u većim koncentracijama, dovodi do oksidacijskog stresa (Gavella, 1996.), pa je porast aktivnosti ovog enzima dobar pokazatelj pojave oksidacijskog stresa u stanicama. Aktivnost SOD-a se hlađenjem spermija i zamrzavanjem smanjuje (Chatdarong i sur., 2012.) te je u pozitivnoj korelaciji s pokretljivošću spermija nakon manipulacije i odmrzavanja (Buffone i sur., 2012.).

Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

Glutation-peroksidaza (EC 1.11.1.9) pripada skupini enzima peroksidaza koje se nalaze u svim eukariotskim stanicama. Štiti stanice od oksidacijskih oštećenja, uklanjajući vodikov peroksid i lipidne hidroperokside uz oksidaciju reduciranog glutathiona. Enzim sadržava četiri atoma selena u obliku selenocisteina (Bhabak i Muges, 2010). Identificirano je najmanje sedam izoenzima GSH-Px, i to citoplazmatska (cGSH-Px ili GSH-Px1), gastrointestinalna (GI-GSH-Px ili GSH-Px2), plazmatska (pGSH-Px ili GSH-Px3), fosfolipid-hidroperoksidna (PH-GSH-Px ili GSH-Px4) te glutathion-peroksidaze GSH-Px5 i GSH-Px6 (Čepelak, 2009.). Razlikuju se po građi, supstratu, ali sve sadržavaju selen u aktivnom centru.

Fosfolipid-hidroperoksidna GSH-Px osobito je potrebna za embriogenezu i mušku plodnost (Vaisberg i sur., 2005.), visoka aktivnost zabilježena je u testisima (Fujii i sur., 2003.). Smanjena aktivnost ovoga enzima dovodi do smanjene plodnosti (Imai i sur., 2001.; Imai i Nakagawa, 2003.). Glutation-peroksidazu iz epididimisa (GSH-Px5) prvi su opisali Ghyselinck i sur. (1989.), a važna je i u zaštiti spermija (Fujii i sur., 2003.).

Glutation-peroksidaza specifična za glavu spermija (sn-GSH-Px) otkrivena je u testisima štakora 2001. godine (Pfeifer i sur., 2001.). Molekularna

masa sn-GSH-Px enzima je 34 kDa i u njoj je sadržano 80 % ukupnog selena u spermijima. Pokazuje slična svojstva kao fosfolipid-hidroperoksidna GSH-Px od koje se razlikuje po N-terminalnoj sekvenciji. Biološka uloga ovog izoenzima glutathion-peroksidaze je stabilizacija kondenziranog kromatina i zaštita DNK spermija od oksidacije, tako da se pri manjku selena u organizmu štakora aktivnost sn-GSH-Px smanjuje na trećinu što rezultira ozbiljnim narušavanjem kondenzacije kromatina (Pfeifer i sur., 2001.).

Katalaza

Katalaza (EC 1.11.1.6) također je enzim koji uklanja vodikov peroksid. Za razliku od GSH-Px u katalizi nije potrebna prisutnost kofaktora glutathiona. Pri fiziološkim koncentracijama vodikova peroksida glavnu ulogu u uklanjanju ima GSH-Px. Katalazna se aktivnost očituje tek pri većim koncentracijama H₂O₂, što govori da je katalaza odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa (Halliwell i Gutteridge, 1999.). Za razliku od male aktivnosti katalaze u spermijima kod ljudi i ovnova, u spermijima bikova aktivnost ovoga enzima nije utvrđena (Bilodeau i sur., 2000.). U stanici se katalaza nalazi najviše u peroksisomima, tako da vodikov peroksid nastao u peroksisomima oksidira katalaza, a onaj nastao u mitohondrijima, endoplazmatskoj mrežici i citoplazmi, uklanja GSH-Px (Halliwell i Gutteridge, 1999.).

Aktivnost katalaze u spermijima vrlo je niska (Fujii i sur., 2003.), uz visoku aktivnost u sjemenoj plazmi (Ball i sur., 2000.; Koskinen, i sur., 2002.).

Paraoksonaza 1

Paraoksonaza 1 (PON1; EC 3.1.8.1.) u serumu jest esteraza ovisna o kalciju koja se sintetizira u jetri, a u serum se izlučuje kao sastavni dio lipoproteina velike gustoće (engl. *high density lipoprotein*, HDL). Paraoksonaza 1 hidrolizira organofosfate te time ima vrlo važnu ulogu u detoksikaciji (Litvinov i sur., 2012.). No, istraživanja su pokazala da PON1 sudjeluje i u zaštiti serumskih lipoproteina od oksidacijskih oštećenja jer hidrolizira oksidirane fosfolipide te tako sprječava njihovo nakupljanje u lipoproteinima male gustoće (engl. *low density lipoprotein*, LDL) (Aviram i sur., 1999.), a ubrzava njihovo uklanjanje s HDL-om (Aviram i sur., 1998.).

Osim što osigurava prijenos PON1 u serumu, HDL pridonosi i aktivnosti i stabilnosti PON1, a time posljedično i funkciji. S tim u vezi, promijenjenoj aktivnosti vjerojatno pridonose promjene sastava HDL-a i lipidnog okruženja enzima (Soran i sur., 2009.). Izračunavanjem omjera PON1/HDL-C dobiva se uvid u specifičnu aktivnost paraoksonaze.

Na aktivnost PON1 utječu brojni čimbenici kao što su spol (Ali i sur., 2003.), dob, hranidba, okoliš te lijekovi i patofiziološki uvjeti (Costa i sur., 2005.). Utvrđene su znatno veće aktivnosti PON1 u serumu mišica u odnosu na mužjake (Ali i sur., 2003.), kod krava (Turk i sur., 2005.; Miyamoto i sur., 2005.) u odnosu na bikove (Iličić i sur., 2013.).

Aktivnost PON1 u sjemennoj plazmi izrazito je mala i kod životinja (Iličić i sur., 2013.) i u uzorcima sjemenne plazme zdravih muškaraca (Verit i sur., 2009.; Marsillach i sur., 2011.). Razlog tomu je vjerojatno činjenica da je PON1 vezan za HDL koji je i kod ljudi i kod bikova (Beer Ljubić i sur., 2009.) u sjemennoj plazmi prisutan u vrlo niskoj koncentraciji. Niske vrijednosti aktivnosti PON1 u sjemennoj plazmi tumače se na različite načine. Verit i sur. (2009.) utvrdili su povezanost niske aktivnosti PON1 u sjemennoj plazmi ljudi sa smanjenom sposobnošću oplodnje, dok Marsillach i sur. (2011.) smatraju da su vrlo niske vrijednosti koncentracije i aktivnosti PON1 u sjemennoj plazmi ljudi posljedica staničnog metabolizma te smatraju kako ovaj enzim nema važnu biološku funkciju u sjemenu.

Glutation (GSH)

Glutation (GSH) je tripeptid (glutaminska kiselina, glicin i cistein) koji je najkoncentriraniji stanični antioksidans. Sadržava sulfhidrilnu skupinu (SH-) i veliki redoks-potencijal te održava unutrašnjost stanice u reduciranom stanju i sudjeluje kao donor elektrona u reakciji katalize peroksida pomoću glutathion-peroksidaze. Koncentracija mu se održava *de novo* sintezom ili redukcijom oksidiranog glutathiona pomoću glutathion-reduktaze (Fujii i sur., 2003.). Oba su procesa učinkovitija u Sertolijevim stanicama te one osiguravaju visoku razinu glutathiona u sjemenu, jer spermatogene stanice imaju mnogo manji kapacitet obnavljanja glutathiona (Fujii i sur., 2003.).

Interakcija ROS-a i antioksidacijskog sustava u fiziološkim uvjetima

Pri fiziološkim uvjetima spermiji koji imaju oplodnu sposobnost proizvode reaktivne kisikove spojeve (ROS) u malim koncentracijama. Mjesta sinteze ROS-a u spermijima nisu poznata, no u somatskim stanicama nastaju u lancu transporta elektrona u mitohondrijima, u metabolizmu masnih kiselina u peroksisomima, citokrom P-450 reakcijama i u fagocitima (Beckam i Ames, 1998.). Reaktivni kisikovi spojevi: superoksidni radikal, vodikov peroksid i dušikov oksid nužni su za normalno odvijanje kapacitacije, akrosomske reakcije spermija i stabilizacije membrane mitohondrija u srednjem dijelu spermija (De Lamirande i sur., 1997.; O' Flaherty i sur., 1999.; Juyena

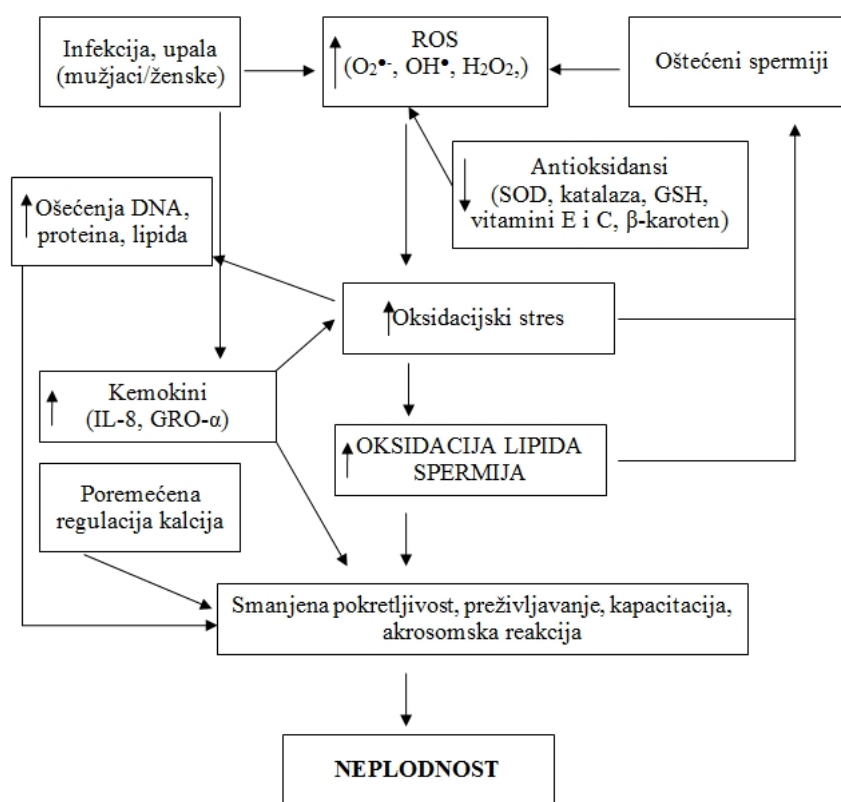
i Stelletta, 2012.). Pri kapacitaciji stvara se superoksidni radikal u većim koncentracijama djelovanjem oksidaza. Superoksidni radikal dismutacijom prelazi u vodikov proksid djelovanjem enzima superoksid-dismutaze. Oba ova slobodna radikala potiču kapacitaciju spermija. Kapacitacija spermija uzrokovana je i djelovanjem dušikova oksida koji se vjerojatno stvara u ženskim spolnim organima (De Lamirande i sur., 1997.). Akrosomska reakcija kod spermija koji su završili proces kapacitacije pobuđuje stvaranje superoksidnog radikala što dovodi do oslobađanja nezasićenih masnih kiselina iz membrane spermija. Također, u odvijanje akrosomske reakcije uključen je i vodikov peroksid (De Lamirande i sur., 1997.).

Oksidacijski stres

Pojam oksidacijski stres opisuje poremećaj ravnoteže između proizvodnje ROS/RNS-a i antioksidacijskih zaštitnih mehanizama. Rezultat je smanjene aktivnosti antioksidacijskih molekula, npr. mutacijama promijenjenih antioksidacijskih enzima kao što su CuZnSOD, MnSOD ili GSH-Px, smanjene koncentracije antioksidansa kao i drugih esencijalnih sastojaka hrane (Halliwell i Gutteridge, 1999.). Uzrok oksidacijskog stresa također može biti pojačano stvaranje ROS-a i RNS-a kao kod sjemena s velikim brojem mrtvih i nezrelih oblika spermija i velikim udjelom upalnih stanica u ejakulatu (Irvine, 1996.; Makker i sur., 2009.).

Peroksidacija lipida kao posljedica djelovanja ROS-a najčešće je istraživana u litetaturi. Lipidska peroksidacija počinje reakcijom radikala dovoljne reaktivnosti s višestruko nezasićenom masnom kiselinom, nakon čega dolazi do širenja ili umnažanja (engl. *propagation*), jer se od početne oksidacije proces može širiti i dovoditi do nastanka lipidskih hidroperoksida velikog broja masnih kiselina (Abuja i Albertini, 2001.; Alaja i sur. 2014.).

Citoplazmatska membrana spermija bogata je višestruko nezasićenim masnim kiselinama (engl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA). Dokozaheksaenska kiselina (DHA) čini oko 50 % ukupnih esterificiranih masnih kiselina u spermijima (Halliwell i Gutteridge, 1999.). Visoki udio PUFA-e daje membrani spermija fluidnost potrebnu za spajanje s jajnom stanicom. Upravo je PUFA glavna meta oksidacije reaktivnim spojevima (Sikka, 1996; Browers i Gaddella, 2003.; Kasimanickam i sur., 2007.). Peroksidacija membranskih PUFA pri oksidacijskom stresu smanjuje fluidnost membrane te time i oplodnu sposobnost spermija. Pritom peroksidaciju u najvećoj mjeri uzrokuje prekomjerno stvaranje superoksidnog radikala (Gavella, 1996.). Oksidacijski stres također



Slika 3. Učinci interakcije oksidacijskog stresa i antioksidansa na funkciju spermija i plodnost (Sikka, 1995).

uzrokuje porast slobodnog ionskog kalcija u stanici, smanjenje koncentracije ATP-a, što ima za posljedicu smanjenu pokretljivost spermija (Halliwell i Gutteridge, 1999.).

Lipidska peroksidacija osobito je izražena u srednjem dijelu i repu zamrznutih/odmrznutih spermija te znatno manje izražena u glavi spermija, dok je antioksidacijska aktivnost najizraženija u glavi svježih spermija (Brouwers i Gadella, 2003.).

Osim staničnih membrana, ROS oštećuje DNK (Agarwal i sur., 2003.), a mogu potaknuti oksidaciju sulfhidrilnih skupina u bjelančevinama te na taj način promijeniti strukturu, poremetiti funkciju spermija te smanjiti njihovu pokretljivost (Maneesh i Jayalekshmi, 2006.).

Glavni izvor ROS-a u većim koncentracijama u nezrelim oblicima spermija jesu proksimalni i distalni protoplazmatski mjehurići koji se nalaze ispod glave ili na repu spermija (Agarwal i sur., 2008.). U sjemenu bikova i ovnova ROS primarno proizvode mrtvi spermiji (Bansal i Bilaspuri, 2011.). Sjemeni plazma može biti izvor ROS-a. Također, važan su izvor ROS-

a leukociti kod ljudi (Agarwal i sur., 2003.) kao i u sjemenu pastuha (Baumber i sur., 2002.). Aladrović i sur. (2013.) utvrdili su da je oko 20 % sjemeni nerastova kontaminirano leukocitima.

Već je spomenuto da se ROS stalno stvara u spermijima, no spermiji nakon pripusta ili umjetnog osjemenjivanja putuju kroz ženske spolne organe gdje su visoke razine kisika za vrijeme procesa oplodnje. Ženski spolni sustav stvara ROS ili potiče njihovo stvaranje u spermijima (Fujii i sur., 2003.) što pospješuje kapacitaciju i akrosomsku reakciju u spermijima. Lipidska peroksidacija uzrokovana niskim koncentracijama ROS-a pospješuje vezanje spermija za zonu pelucidu i oslobađanje nezasićenih masnih kiselina iz membrane spermija (De Lamiran-de i sur., 1997.).

Spermiji u procesima pripreme za umjetno osjemenjivanje (zamrzavanje/otapanje) izloženi su štetnom djelovanju ROS-a u većoj mjeri (Bilodeau i sur., 2000.).

Učinak oksidacijskog stresa na oksidacijska oštećenja spermija i smanjenje plodnosti prikazan je na slici 3.

Reaktivni spojevi dušika i kisika u fiziološkim uvjetima nužni su za normalno odvijanje kapacitacije i akrosomske reakcije spermija, no pri većim koncentracijama dovode do oksidacijskog stresa i neplodnosti kod muških rasplodanjaka. Glavni izvor ROS-a i RNS-a u većim koncentracijama jesu nezreli oblici spermija, mrtvi spermiji i leukociti koji kontaminiraju sjeme. Spermije od oksidacijskog stresa štite antioksidansi u njima i sjemenoj plazmi: supreroksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, katalaza, paraoksonaza 1, glutation, abumini, vitamini E i C.

Literatura

- ABUJA, P. M., R. ALBERTINI (2001): Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 306, 1-17.
- AGARWAL, A., A. RAMADAN, M. D. SALEH, M. A. BEDAIWY (2003): Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 4, 829-843.
- ALADROVIĆ, J., D. CARIĆ, B. BEER LJUBIĆ, R. LAŠKAJ, M. KARADJOLE, I. MAJIĆ BAJIĆ, F. MARKOVIĆ, N. MALTAR-STRMEČKI (2013): Reduction of boar semen sperm motility by oxidation on membrane lipid bilayer. The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession" (Zagreb, 3. - 4. listopada 2013). Book of Abstracts, Zagreb (73-73).
- ALAJA, A., M. F. MUÑOZ, S. ARGÜELLES (2014): Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. 2014, Article ID 360438, 31 pages, 2014. doi:10.1155/2014/360438
- ALI, B. A., Q. ZHANG, Y. K. LIM, D. FANG, L. RETNAM, S-K. LIM (2003): Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 824-829.
- AVIRAM, M., M. ROSENBLAT, C. L. BISGAIER, R. S. NEWTON, S. L. PRIMO-PARMO, B. N. LA DU (1998): Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its function. *J. Clin. Invest.* 101, 1581-1590.
- AVIRAM, M., M. ROSENBLAT, S. BILLECKE, J. EROGUL, R. SORENSON, C. L. BISGAIER, R. S. NEWTON, B. N. LA DU (1999): Human serum paraonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 892-894.
- BALL, B. A., C. G. GRAVANCE, V. MEDINA, J. BAUMBER, I. K. LIU (2000): Catalase activity in equine semen. *Am. J. Vet. Res.* 61, 1026-1030.
- BANASZEWSKA, D., B. BIESIADA-DRZAZGA, K. ANDRASZEK (2015): Frequency of Cytoplasmic Droplets Depends on the Breed and Age of Insemination Boars. *Folia Biol. (Kraków)*, 1, 9-18. doi:10.3409/fb63_1.9
- BANSAL, A. K., G. S. BILASPURI (2011): Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*, Volume 2011, Article ID 686137 doi:10.4061/2011/686137.
- BAUMBER, J., B. A. BALL (2005) Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues *Am. J. Vet. Res.* 66, 1415-1419.
- BAUMBER, J., A. VO, K. SABEUR, B. A. BALL (2002): Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1025-1033.
- BEER LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S. MARENJAK, I. MAJIĆ-BALIĆ, R. LAŠKAJ S. MILINKOVIĆ-TUR (2012): Biochemical properties of bull spermatozoa separated in iodixanol density solution. *Res. Vet. Sci.* 92, 292-294.
- BEER-LJUBIĆ, B., J. ALADROVIĆ, T. S. MARENJAK, R. LAŠKAJ, I. MAJIĆ-BALIĆ, S. MILINKOVIĆ-TUR (2009): Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology* 72, 1132-1140.
- BHABAK, K. P., G. MUGESH (2010): Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Acc. Chem. Res.* 43, 1408-1419.
- BILODEAU, J. F., S. CHATTERJEE, M. A. SIRARD, C. GAGNON (2000): Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 282-288.
- BROWERS, J. F. H., B. M. GADELLA (2003): In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1382-1391.
- BUFFONE, M. G., J. C. CALAMERA, S. BRUGO-OLMEDO, S. De VINCENTIIS, M. M. CALAMERA, B. T. STOREY, G. F. DONCEL, J. G. ALVAREZ (2012): Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 97, 2,293-298.
- ČERVENY, C., H. E. KÖNIG, H-G. LIEBICH (2009):

- Muški spolni organi. U: Anatomija domaćih životinja. Udžbenik i atlas. Naklada Slap (417-433).
- CERGOLJ, M., M. SAMARDŽIJA (2006): Veterinarska andrologija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
 - CHATDARONG, K., A. CHAIVECHAKARN, P. THUWANUT, S. PONGLOWHAPAN (2012): Effects of Cold Storage Prior to Freezing on Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase Activities, Level of Total Reactive Oxygen Species and Sperm Quality in Dogs. *Reprod. Dom. Anim.* 47 (Suppl. 6), 274-277.
 - COSTA, L. G., A. VITALONE, T. B. COLE, C. E. FURLONG (2005): Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem. Pharmacol.* 69, 541-550.
 - ČEPELAK, I. (2009): Slobodni radikali i antioksidansi. U: Čvorišćec, D., I. Čepelak: Štrausova medicinska biokemija. Medicinska naklada Zagreb (638-648).
 - De LAMIRANDE E., H. JIANG, A. ZINI, H. KODAMA, C. GAGNON (1997): Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2, 48-54.
 - REECE, W. O. (2015): *Duke's Physiology of Domestic Animals.* John Wiley & Sons, Inc. Iowa, SAD.
 - FUJII, J., Y. IUCHI, S. MATSUKI, T. ISHII (2003): Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J. Androl.* 5, 231-242.
 - GAVELLA, M (1996): Uloga pro i antioksidativnih mehanizama u humanoј reprodukciji. *Biochem. Med.* 1, 38.
 - GHYSELINCK, N. B., C. JIMENEZ, J. P. COURTY DUFAURE (1989): Androgen-depend messenger RNA (S) related to secretory proteins in the mouse epididymis. *J Reprod. Fertil.* 85, 631-639.
 - GURLER, H., O. CALISICI, H. BOLLWEIN (2015): Inter and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 155, 99-105.
 - GUYTON, A. C., J. E. HALL (2006): *Medicinska fiziologija.* Medicinska naklada, Zagreb (996-1010).
 - HALLIWEL, B., J. M. C. GUTTERIDGE (1999): *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press. Oxford.
 - ILIČIĆ, L., E. KLEPO, B. BEER LJUBIĆ, R. LAŠKAJ, I. MAJIĆ-BALIĆ, L. RADIN, I. ŠTOKOVIĆ, J. ALADROVIĆ (2013): Paraoxonase 1 activity and lipid concentrations in serum and seminal plasma of simmental bulls. The 5th International Congress "Veterinary Science and Profession" (Zagreb, 3. - 4. listopada 2013). Book of Abstracts. Zagreb (72-72).
 - IMAI, H., K. SUZUKI, K. ISHIZAKA, S. ICHINOSE, H. OSHIMA, I. OKAYASU, K. EMOTO, M. UMEDA, Y. NAKAGAWA (2001): Failure of the Expression of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in the Spermatozoa of Human Infertile Males. *Biol. Reprod.* 64, 674-683.
 - IMAI, H., Y. NAKAGAWA (2003): Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2, 145-169.
 - IRVINE, D. S. (1996): Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev. Reprod.* 1, 6-12.
 - JEYENDRAN, R. S. (2003): *Protocols for semen analysis in clinical diagnosis.* Parthenon Publishing Group, New York, SAD.
 - JUYENA, N. S., C. STELLETTA (2012): Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *J. Androl.* 4, 536-551.
 - KADIRVE, G., S. KUMAR, S. K. GHOSH, P. PERUMAL (2014): Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to lipid peroxidation and semen quality. *Asian Pac. J. Reprod.* 3, 210-217.
 - KASIMANICKAM, R., V. KASIMANICKAM, C. D. THATCHER, R. L. NEBEL, B. G. CASSELL (2007): Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology* 67, 1004-1012.
 - KAYA, A., S. BIRLER, L. ENWALL, E. MEMILI (2014): Determinants of Sperm Morphology. U: *Animal Andrology Theories and Applications.* CAB International, London UK (34-56).
 - KOSKINEN, E., M. KARLSSON, T. REILAS, S. SANKARI, A. L. ESALA, T. KATILA (2002): Catalase activity and total protein in fractionated stallion seminal plasma. *Theriogenology* 58, 337-340.
 - LITVINOV, D., H. MAHINI, M. GARELNABI (2012): Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases. *N. Am. J. Med. Sci.* 4, 523-532.
 - MAKKER, K., A. AGARWAL, R. SHARMA (2009): Oxidative stress & male infertility. *Indian J. Med. Res.* 129, 357-367.
 - MANEESH, M., K. JAJLEKSHMI (2006): Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian J. Clin. Biochem.* 21, 80-89.
 - MARSILLACH, J., R. LAFUENTE, M. A. CHECA, C. MAESTRE-MARTÍNEZ, E. FABIÁN, M. BRASSESCO, R. BELTRÁN-DEBÓN, G. ARAGONÉS, R. CARRERAS,

- J. PEDRO-BOTET, J. JOVEN, J. CAMPS (2011): Para-oxonase-1 is only present in traceable amounts in seminal fluid and does not show any relationship with male subfertility. *BJU Int.* 108, 566-570.
- MRUK, D. D., B. SILVESTRINI, M. Y. MO, C Y. CHENG (2002): Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65, 305-311.
 - O'FLAHERTY C. M., N. B. BEORLEGUI, M. T. BECONI (1999): Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 52, 289-301.
 - OOKAWARA, T., N. IMAZEKI, O. MATSUBARA, T. KIZAKI, S. OH-ISHI, C. NAKAO, Y. SATO, H. OHNO (1998): Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am. J. Physiol.* 275 (Cell Physiol. 44), C840-C847.
 - PARKINSON, T. J. (1996): The male animal; Structure and function of spermatozoa. U: *Veterinary Reproduction & Obstetrics*. Seventh edition. W. B. Saunders Company Ltd. (561-563).
 - PERUMAL, P. (2014): Effect of Superoxide Dismutase on Semen Parameters and Antioxidant Enzyme Activities of Liquid Stored (5 °C) Mithun (*Bos frontalis*) Semen. *J. Anim.* 2014, Article ID 821954, 9 pages. doi:10.1155/2014/821954
 - PESCH, S., M. BERGMANN, H. BOSTEDT (2003): Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 66, 307-313.
 - PFEIFER, H., M. CONRAD, D. ROETHLEIN, A. KYRIAKOPOULOS, M. BRIELMEIER, G. W. BORNKAMM, D. BEHNE (2001): Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol crosslinking during sperm maturation. *FASEB J.* 15, 1236-1238.
 - RAIJMAKERS, M. T. M., H. M. J. ROELOFS, E. A. P. STEEGERS, R. P. M. STEEGERS-THEUNISSEN, T. P. J. MULDER, M. F. C. M. KNAPEN, W. YEE WON, W. H. M. PETERS (2003): Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1, 169-172.
 - SETCHELL, B. P. (2014): Semen and its Constituents. U: *Animal Andrology Theories and Applications*. CAB International, London UK (3-11).
 - SHADAN, S., P. S. JAMES, E. A. HOWES, R. JONES (2004): Cholesterol Efflux Alters Lipid Raft Stability and Distribution during Capacitation of Boar Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 71, 253-265.
 - SIKKA, S. C. (1996): Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front. Biosci.* 1, 78-86.
 - SIKKA, S. C., M. RAJASEKARAN, W. J. HELLESTROM (1995): Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16, 464-468.
 - SORAN, H., N. N. YOUNIS, V. CHARLTON-MENYS, N. P. DURRINGTO (2009): Variation in paraoxonase-1 activity and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 265-274.
 - SURAI, P. F. (2002): Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press, Nottingham.
 - TURK, R., D. JURETIĆ, D. GEREŠ, N. TURK, B. REKIĆ, V. SIMEON-RUDOLF, M. ROBIĆ, A. SVETINA (2005): Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res. Vet. Sci.* 79, 15-18.
 - VAISBERG, C. N., L. V. JELEZARSKY, B. DISHLIANOVA, T. A. CHAUSHEV (2005): Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. *Theriogenology* 2, 416-428.
 - VERIT, F. F., A. VERIT, H. CIFTCI, O. EREL, H. ÇELIK (2009): Para-oxonase-1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. *J. Androl.* 30, 183-189.
 - WITTE, T. S., S. SCHÄFER-SOMI (2007): Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 181-193.
 - ZINI, A., E. DE LAMIRANDE, C. GAGNON (1993): Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 183-188.