

Uloga oksidacijskog stresa u etiologiji muške neplodnosti

The Role of Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility

Romano Oguić^{1, 2*}, Marija Gasparović², Dean Markić¹, Ivan Vukelić¹, Ivan Marin Sušanji¹

Sažetak. Neplodnost pogađa 10-15 % parova, a u 30 % slučajeva uzrok je muški faktor. Među ključnim uzrocima muške neplodnosti nalazi se oksidacijski stres, stanje poremećene ravnoteže između oksidacije i redukcije koje rezultira stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Molekule ROS imaju važne fiziološke uloge, uključujući kapacitaciju spermija, hiperaktivaciju i fuziju s oocitom, no njihovo prekomjerno stvaranje uzrokuje štetu, poput lipidne peroksidacije, fragmentacije DNA i apoptoze. Značajne količine ROS-a nastaju u stanicama spermatogenetske loze, ali i kao nusprodukt aerobnog metabolizma te u leukocitima s peroksidaznom aktivnošću. Stanja poput varikokele, infekcija, dijabetesa, alkoholizma i pretilosti, zajedno s pušenjem, izloženosti toksinima i ftalatima dodatno pogoršavaju oksidacijski stres. Iatrogeni čimbenici, uključujući tehnike potpomognute oplodnje, krioprezervaciju i liječenje malignih bolesti radioterapijom i kemoterapijom, također povećavaju rizik. Obranu protiv oksidacijskog stresa pružaju antioksidansi koji neutraliziraju ROS. Enzimski antioksidansi, poput superoksid-dismutaze (SOD), katalaze i glutation-peroksidaze, prisutni su u spermijima i sjemenoj tekućini. Neenzimski antioksidansi, poput vitamina E, vitamina C, cinka i selena, unose se prehranom. Nedostatak antioksidansa zbog neuravnotežene prehrane povećava rizik od oksidacijskog stresa, stoga je pravilna i uravnotežena prehrana ključna za očuvanje plodnosti. Učinkovita strategija za prevenciju uključuje i smanjenje izloženosti rizičnim čimbenicima te primjenu dodataka prehrani s antioksidansima u odabranim slučajevima.

Ključne riječi: antioksidansi; oksidacijski stres; reaktivni kisikovi spojevi; varikokela

Abstract. Infertility affects 10-15% of couples, with male factors accounting for 30% of cases. Oxidative stress, a disruption in redox balance leading to the production of reactive oxygen species (ROS), is a significant contributor to male infertility. ROS play crucial physiological roles, such as sperm capacitation, hyperactivation, and oocyte fusion, but excessive ROS levels cause damage, including lipid peroxidation, DNA fragmentation, and apoptosis. ROS are generated in spermatogenic cells, as byproducts of aerobic metabolism, and in leukocytes with peroxidase activity. Conditions like varicocele, infections, diabetes, alcoholism, and obesity, along with smoking, toxin exposure, and phthalates, exacerbate oxidative stress. Iatrogenic factors, including assisted reproduction techniques, cryopreservation, radiotherapy, and chemotherapy, further increase the risk. Defense against oxidative stress is provided by antioxidants, which neutralize ROS. Enzymatic antioxidants, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase, are found in sperm and seminal fluid. Non-enzymatic antioxidants, such as vitamins E and C, zinc, and selenium, are obtained through diet. Antioxidant deficiency due to poor nutrition heightens the risk of oxidative stress, making a balanced diet essential for fertility. Preventive strategies include reducing exposure to risk factors and, in selected cases, the use of antioxidant supplements.

Keywords: antioxidants; oxidative stress; reactive oxygen species; varicocele

¹ Klinički bolnički centar Rijeka, Klinika za urologiju, Rijeka, Hrvatska

² Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Katedra za urologiju, Rijeka, Hrvatska

***Dopisni autor:**

Prof. dr. sc. Romano Oguić, dr. med.
Klinički bolnički centar Rijeka, Klinika za urologiju
Ul. Tome Strižića 3, 51000, Rijeka, Hrvatska
E-mail: romano.oguc@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Neplodnost je nemogućnost postizanja trudnoće nakon godinu dana nezaštićenih spolnih odnosa. Pogađa 10-15 % parova, pri čemu je muškarac uzrok u oko 30 % slučajeva. U 15 % slučajeva uzrok neplodnosti ostaje nepoznat, u približno 35 % uzrok je žena, dok je u 20 % slučajeva uzrok prisutan kod oba partnera. Prema jednoj klasifikaciji, uzroci muške neplodnosti dijele se na pretestikularne, testikularne i posttestikularne¹.

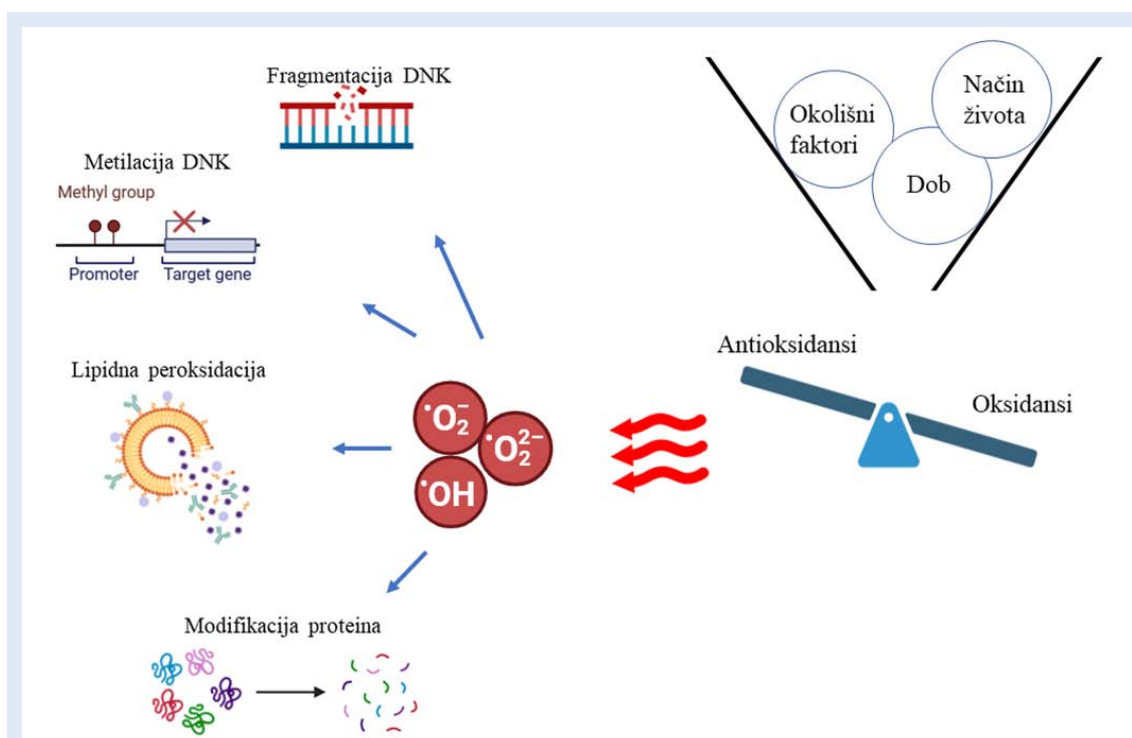
Do oksidacijskog stresa dolazi kada je narušena ravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva i aktivnosti antioksidansa. Oksidacijski stres može utjecati na mnoge bolesti i stanja uključujući i neplodnost.

Oksidacijski stres ima složen utjecaj na molekularne procese u muškom reproduktivnom sustavu, pri čemu životne navike, kronične i infektivne bolesti te okolišni čimbenici igraju važnu ulogu². Oksidacijski stres ima složen utjecaj na molekularne procese u muškom reproduktivnom sustavu, pri čemu životne navike, kronične i infektivne bolesti te okolišni čimbenici igraju važnu ulogu. U dijagnostičkoj obradi neplodnog para važna je detaljna anamneza u kojoj liječnik ispituje podatke o sistemskim bolestima, kongenitalnim anomalijama, kirurškim zahvatima na abdomenu, zdjelici i ingvinalnoj regiji, transuretralnim zahvatima, uzimanju lijekova te kroničnoj izloženosti ionskom zračenju, duhanskom dimu i visokim temperaturama. Seksualna anamneza uključuje informacije o učestalosti spolnih odnosa, načinu planiranja, kvaliteti erekcije, korištenju kontracepcije i lubrikanata te podatke o ranijim trudnoćama s istim ili drugim partnerima. Tijekom fizikalnog pregleda potrebno je obratiti pažnju na razvoj sekundarnih spolnih karakteristika, status genitalnih organa te palpatorni nalaz prostate. Od laboratorijskih pretraga potrebno je provesti kompletnu krvnu sliku, analizu urina, urinokulturu i analizu ejakulata¹. Oksidacijski stres krije se u gotovo polovici slučajeva neplodnosti u muškaraca pri čemu dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva koji u manjim količinama sudjeluju u nekim fiziološkim procesima, među-

tim u velikim količinama narušavaju morfologiju spermija i oštećuju njihov DNA².

OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres predstavlja stanje u kojem dolazi do poremećaja ravnoteže između oksidacijskih i redukcijskih reakcija, s pomakom prema oksidaciji. U takvim uvjetima dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*; ROS) – visoko reaktivnih molekula s jednim nesparenim elektronom, što ih čini izrazito nestabilnima. U nastojanju za stabilizacijom, molekule ROS stupaju u reakcije s molekulama u neposrednoj okolini, pri čemu izazivaju oštećenja na nukleinskim kiselinama, proteinima i lipidima. Takva oštećenja mogu dovesti do nastanka mutacija, razvoja karcinoma, autoimunih bolesti te ateroskleroze. Slobodni radikali s najvećom reaktivnošću i utjecajem na tkiva jesu superoksidni radikal ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) i perhidroksilni radikal ($\cdot\text{O}_2\text{H}$). Slobodni kisikovi radikali nastaju u reakcijama oksidativnog metabolizma u mitohondrijima svake stanice te kao odgovor stanice na prisutnost ksenobiotika, citokina i bakterijskih patogena. Ključni izvori slobodnih kisikovih radikala u ljudskom organizmu uključuju ionizirajuće zračenje, neenzimske reakcije prijelaznih metala, respiracijski prasak aktiviranih makrofaga te fiziološku oksidaciju reduciranih flavinskih koenzima. Ionizirajuće zračenje inducira lizu vode i formiranje hidroksilnih radikala, dok prijelazni metali u reakcijama s kisikom ili vodikovim peroksidom također stvaraju hidroksilne radikale. Dušikov monoksid može dodatno potaknuti oslobađanje hidroksilnog radikala u određenim biokemijskim reakcijama. Oksidativni prasak aktiviranih makrofaga predstavlja imunološku reakciju usmjerenu na eliminaciju fagocitiranih mikroorganizama, pri čemu nastaje superoksidni radikal². U respiratornom lancu aerobnog metabolizma u mitohondrijima, oksidacija flavinskih koenzima dovodi do formiranja slobodnih kisikovih radikala. Antioksidansi su molekule koje neutraliziraju slobodne kisikove radikale i štite stanice od oksidacijskog stresa³. Razvrstavaju se u tri glavne skupine: enzime, vitamine i polifenole. U peroksisomima su prisutni enzimi poput superoksid-dismutaze, katalaze i peroksidaza, koji sudjeluju u uklanjanju superok-



Slika 1. Utjecaj ROS-a na kvalitetu sperme na više razina – pregled glavnih egzogenih utjecaja i opasnih učinaka na spermatozoidne stanice

sidnih radikala. Glutation-peroksidaza je enzim koji reducira lipidne perokside nastale djelovanjem radikala na stanične membrane i plazmatske lipoproteine, pri čemu se sam oksidira. Oksidirani glutacion zatim reducira enzim NADPH-glutation-reduktaza. Vitamini E i C također međusobno djeluju u reduciranju lipidnih peroksida, pri čemu nastaju askorbat i dehidroaskorbat, dok askorbat dodatno pokazuje antioksidativno djelovanje. Mokraćna kiselina i polifenoli iz hrane predstavljaju vodotopljive antioksidanse, dok su ubikinol i beta-karoten antioksidansi topljivi u lipidima³. Svi endogeni te širok raspon egzogenih (okolišnih) čimbenika utječu na kvalitetu sperme, time uzrokujući mušku neplodnost^{4,5}. Oni dovode do oksidativnih modifikacija DNK, proteina i lipida koji su ključne komponente spermatozoida (SPZ), modificirajući njihove vitalne fiziološke funkcije⁶. Ovi su utjecaji shematski prikazani na slici 1.

FIZIOLOŠKA ULOGA REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJEVA U SPERMATOGOENEZI

Iako visoke razine slobodnih radikala negativno utječu na stanice tijekom svih faza spermatogeneze i spermiogeneze, u kontroliranim količinama

igraju ključnu ulogu u normalnim fiziološkim procesima. Superoksidni radikal, vodikov peroksid, dušikov oksid ($\cdot\text{NO}$) i peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) sudjeluju u kapacitaciji spermija – procesu koji se odvija u ženskom reproduktivnom sustavu i priprema spermije za oplodnju. Tijekom njihova putovanja kroz jajovod do mjesta oplodnje, spermiji počinju proizvoditi povećane količine reaktivnih kisikovih radikala³. Ova kontrolirana produkcija, posebno superoksidnog radikala, aktivira adenilat-ciklazu koja povećava razinu cAMP-a, što aktivira protein-kinazu A (PKA). To dalje potiče polimerizaciju aktina, ključnu za hiperaktivaciju spermija, odnosno njihovu pojačanu pokretljivost. Samo hiperaktivirani spermiji mogu proći akrosomsku reakciju, probiti koronu radijatu oko oocyte i vezati se za zonu pelucidu⁵. Studije su pokazale da ljudski spermiji proizvode reaktivne kisikove radikale različitim mehanizmima. NADPH oksidaza na staničnoj membrani i mitohondrijska oksidoreduktaza ovisna o NADH ključne su u stvaranju superoksidnog radikala. Superoksid-dismutaza (SOD) zatim konvertira superoksid u vodikov peroksid. Nadalje, sintetazom dušikova oksida proizvodi se dušikov oksid, koji u reakciji sa supe-

roksidom tvori peroksinitrit⁶. Peroksinitrit djeluje kao snažan oksidans koji inducira oksidaciju kolesterola u membrani spermija. Nastali oksisteroli uklanjaju se iz membrane, povećavajući njezinu fluidnost, što je od esencijalne važnosti za fuziju spermija s oocitom⁷. U ejakulatu se, osim stanica spermatogenetske loze, mogu pronaći i leukociti, koji igraju ključnu ulogu u obrani od infekcija, ali također predstavljaju značajan izvor reaktivnih kisikovih spojeva (ROS)⁸. Većinu tih leukocita čine peroksidaza-pozitivni polimorfonuklearni neutrofili i makrofagi, koji primarno potječu iz prostate i sjemenih mjehurića. Prisutnost proinflammatoryh citokina, poput IL-8, i smanjena aktivnost antioksidativnih enzima, poput superoksid-dismutaze (SOD), potiču respiracijski prasak i aktivaciju leukocita⁷. Aktivirani leukociti tada proizvode do 100 puta više reaktivnih kisikovih spojeva u usporedbi s neaktiviranim leukocitima, zbog čega su infekcije važan uzrok oksidacijskog stresa. Spermiji, zbog svoje potrebe za pokretljivošću, trebaju veliku količinu energije koju proizvode aerobnim metabolizmom u mitohondrijima, prisutnima u visokom broju u njihovom srednjem dijelu. Mitohondriji su primarno mjesto proizvodnje slobodnih kisikovih radikala u spermijima, a molekule ROS stvaraju se kao nusprodukt respiratornog lanca. Zbog toga je ekstenzivan aerobni metabolizam jedan od glavnih uzroka oksidacijskog stresa u spermijima^{8,9}. Stanice spermatogenetske loze tijekom sazrijevanja spontano proizvode slobodne kisikove radikale, pri čemu je spermatogeneza metabolički vrlo aktivan proces u kojemu superoksidni radikal nastaje kao nusprodukt staničnog disanja⁹. Istraživanja pokazuju da najveće količine reaktivnih kisikovih spojeva proizvode nezrele stanice, dok zreli spermiji stvaraju najmanje. Nadalje, spermiji s defektnom morfologijom proizvode više reaktivnih kisikovih radikala od morfološki normalnih spermija, pri čemu su spermiji s abnormalnostima u obliku glave i prisutnim rezidualnim citoplazmatskim tjelešcima posebno aktivni u stvaranju ROS-a⁷. Sve do trenutka izbacivanja zrelih spermija u sjemeni kanal, Sertolijeve stanice osiguravaju zaštitu od oksidacijskog stresa. Nakon izlaska iz zaštitne okoline Sertolijevih stanica spermiji postaju izrazito osjetljivi na oksidacijski stres jer više nemaju te zaštitne me-

hanizme, a njihovi vlastiti sustavi obrane od oksidacijskog stresa vrlo su ograničeni⁸⁻¹⁰.

PATOLOŠKI UČINCI OKSIDACIJSKOG STRESA

S obzirom na visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, stanična membrana spermatogenih stanica izrazito je osjetljiva na oksidativni stres. Ove masne kiseline, iako ključne za fluidnost membrane i regulaciju spermatogeneze, predstavljaju lako dostupne mete za reaktivne kisikove vrste. U uvjetima oksidativnog stresa slobodni radikali iniciraju kaskadu reakcija lipidne peroksidacije, koja se odvija u tri faze: inicijaciji, propagaciji i terminaciji. Tijekom inicijacije, reaktivni kisikovi spojevi napadaju dvostruke veze polinezasićenih masnih kiselina, stvarajući lipidne radikale. U fazi propagacije dolazi do lančane reakcije u kojoj lipidni radikali reagiraju s kisikom, stvarajući peroksilne radikale koji dalje oksidiraju susjedne masne kiseline. Proces se nastavlja sve dok ne dođe do terminacije, kada se dva lipidna radikala spoje ili reagiraju s antioksidansima. Posljedice lipidne peroksidacije su višestruke i uključuju gubitak integriteta membrane, smanjenje fluidnosti, povećanu propusnost za ione te oštećenje membranskih proteina i enzima. Produkcijom toksičnih aldehida, kao što su malondialdehid (MDA), akrolein i 4-hidroksinonenal, lipidna peroksidacija dodatno oštećuje stanične strukture i potiče stvaranje novih reaktivnih kisikovih vrsta, čime se pojačava oksidativni stres. Oštećenja uzrokovana lipidnom peroksidacijom mogu dovesti do poremećaja u proizvodnji ATP-a, oštećenja aksoneme, morfoloških defekata srednjeg dijela spermija te smanjene pokretljivosti i vijeka trajanja spermija⁹. Addukti DNA baza, kao što je 8-OH-dG, koji nastaju kao posljedica oksidativnog oštećenja, mogu se ugraditi u CpG otoke. Prisutnost ovih adukata ometa interakciju između DNA i metiltransferaza DNA, enzima koji su odgovorni za dodavanje metilnih skupina na citozin. To dovodi do globalne hipometilacije DNA, stanja u kojem je smanjen stupanj metilacije DNA. Takva hipometilacija povezana je s različitim patološkim stanjima, uključujući Sertolijev sindrom stanica, rak testisa i hipospermatogenezu kod ljudi¹¹⁻¹³. Spermatogeneza je praćena jedinstvenim procesima kondenzacije kromatina, kojima se histoni

zamjenjuju s protaminima. Ova specifična organizacija kromatina u spermatozoidima omogućuje maksimalnu kompaktnost genoma i štiti DNA od oštećenja. Protaminizacija čini kromatin otpornijim na djelovanje oksidativnog stresa i smanjuje rizik od različitih vrsta mutacija, uključujući mutacije *frame-shift*, delecije, poprečne veze i kromosomske aberacije. Međutim, nepotpuna protaminizacija može dovesti do povećane osjetljivosti DNA na oksidativni stres. Oksidativni stres inducira brojne vrste oštećenja DNA, uključujući jednostruke lomove, koji su direktna posljedica napada reaktivnih kisikovih vrsta na DNA te dvostruke lomove, koji su često posljedica adukcije DNA s toksičnim produktima lipidne peroksidacije, kao što je 4-hidroksinonenal. Oštećenja DNA u spermatozoidima imaju ozbiljne posljedice za reproduktivno zdravlje, uključujući neplodnost, ponavljane spontane pobačaje i povećan rizik od urođenih malformacija kod potomstva⁹. Reaktivne kisikove vrste (ROS) mogu oštetiti integritet mitohondrijske membrane, što dovodi do oslobađanja citokroma c u citoplazmu. Citokrom c aktivira kaskade kaspaza, proteaza koje iniciraju programiranu smrt stanice (apoptozu). Iako je apoptoza normalan fiziološki proces koji služi za uklanjanje oštećenih ili nefunkcionalnih stanica iz spermatogeneze, prekomjerna apoptoza može dovesti do smanjenja broja spermatozoida u ejakulatu i, posljedično, neplodnosti¹⁴.

VARIKOKELA I MOGUĆI UTJECAJ OKSIDACIJSKOG STRESA

Varikokela je jedan od najvažnijih uzroka muške neplodnosti, karakterizirana venskim zagušenjem u pampiniformnom pleksusu unutar funikulusa spermaticusa. Ovaj zastoj uzrokuje venski refluks i dilataciju vena, što rezultira povišenom temperaturom testisa, negativno utječući na spermatogenezu. Ljevostrana varikokela češća je od desnostrane zbog anatomske položaja lijeve unutarnje spermatične vene, koja pod pravim kutom utječe u lijevu bubrežnu venu, stvarajući povećani tlak u veni. Varikokele su klasificirane u tri stupnja: stupanj I označava blagi oblik varikokele, palpabilan samo tijekom Valsalvina manevra; stupanj II označava srednje izraženu varikokelu koja je palpabilna bez Valsalvina manevra, ali nije vid-

ljiva; dok je stupanj III velika varikokela vidljiva kroz kožu skrotuma. Varikokela pridonosi oksidacijskom stresu kroz mehanizme toplinskog stresa, hipoksije i upalnih promjena unutar testisa. Optimalna temperatura za spermatogenezu je približno 2,5 °C niža od tjelesne temperature, međutim pacijenti s varikokelom pokazuju prosječno povećanje skrotalne temperature od 1,5 °C u usporedbi sa zdravim muškarcima. Proteini odgovora na toplinski stres (engl. *heat shock proteins*; HSP), posebno HSPA2, ključni su za regulaciju transkripcije, translacije i prijenosa signala, a smanjena aktivnost HSPA2 u pacijenata s varikokelom može pridonijeti denaturaciji proteina, apoptozi i neplodnosti. Zanimljivo, resekcija varikokele može povećati aktivnost HSPA2, što ukazuje na reverzibilnost učinaka varikokele na HSP ekspresiju. Povišena temperatura također povećava stanični metabolizam, što dovodi do pojačane proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Uz to, toplinski stres inducira stvaranje reaktivnih dušikovih spojeva, koji mogu prodrijeti kroz staničnu membranu spermija i reagirati sa superoksidnim radikalom, stvarajući snažne oksidacijske agense kao što su peroksinitrit i peroksinitritna kiselina. Peroksinitrit (ONOO⁻) je reaktivan oblik dušika koji nastaje reakcijom dušikovog oksida (NO) i superoksidnog aniona (O₂⁻). Ova molekula ima značajan utjecaj na ljudsko zdravlje, posebno u kontekstu muške neplodnosti, zbog svoje uloge u oksidativnom stresu. istraživanja sugeriraju da visoke koncentracije peroksinitrita mogu ometati hormonalnu ravnotežu potrebnu za normalno funkcioniranje testisa¹¹. Peroksinitrit se često povezuje s drugim uzrocima muške neplodnosti, kao što su varikokela, infekcije i upale testisa¹⁴. Hipoksija, s druge strane, narušava funkciju proteina uključenih u elektronski transportni lanac, čime dodatno pridonosi oksidacijskom stresu. Nadalje, interakcija upalnih citokina i ROS-a dodatno pogoršava stanje, što može rezultirati smanjenom plodnošću kod muškaraca s varikokelom¹⁻¹⁵.

EKSTRINZIČNI IZVORI OKSIDACIJSKOG STRESA

Razni okolišni čimbenici, životne navike, bolesti i stanja mogu izazvati oksidacijski stres u muškom reproduktivnom sustavu, negativno utječući na

plodnost. Infekcije urogenitalnog trakta među glavnim su uzrocima jer invazija mikroorganizama aktivira polimorfonuklearne leukocite, što povećava proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i inducira oksidacijski stres. Prostatitis, koji pogađa do 50 % muškaraca barem jednom tijekom života, povezan je s bakterijama koje potječu iz urotrakta ili pripadaju spolno prenosivim uzročnicima. Najčešći uzročnici uključuju streptokoke (*S. viridans* i *S. pyogenes*), koagulaza-negativne stafiločke (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*), gram-negativne bakterije (*E. coli*, *Proteus mirabilis*) te atipične bakterije (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*). Od spolno prenosivih uzročnika najčešća je bakterija *Chlamydia trachomatis*. Virusne infekcije također mogu pridonijeti neplodnosti posredovanoj oksidacijskim stresom, pri čemu se infekcija virusom *Herpes simplex* (HSV) smatra jednim od ključnih čimbenika². Pretilost je povezana s brojnim zdravstvenim komplikacijama, uključujući i smanjenu plodnost muškaraca. Višak masnog tkiva pridonosi razvoju kronične upale niskog stupnja, što potiče prekomjernu proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Osim toga, adipociti pretilih osoba luče disreguliran spektar adipocitokina, dodatno pojačavajući oksidativni stres. Kumulativni učinak oksidativnog stresa dovodi do oštećenja DNA, proteina i lipida u spermatozoidima, što rezultira smanjenjem njihove pokretljivosti, morfologije i sposobnosti oplodnje. Kod pretilih muškaraca često se uočava i povećanje temperature skrotuma zbog nakupljanja masnog tkiva u preponama. Ova hipertermija, slično kao i kod varikokele, negativno utječe na spermatogenezu, smanjujući proizvodnju spermija i pogoršavajući njihovu kvalitetu⁸. Dijabetes melitus predstavlja značajan rizični faktor za razvoj muške neplodnosti. Poremećena glukozna homeostaza dovodi do niza fizioloških promjena koje negativno utječu na spermatogenezu i erektilnu funkciju. Oksidativni stres, karakteriziran povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i smanjenom antioksidativnom obranom, prepoznat je kao ključni mehanizam koji posreduje u razvoju mnogih komplikacija povezanih s dijabetesom, uključujući i neplodnost. Hiperglikemija potiče mitohondrijsku disfunkciju i povećanu proizvodnju superoksida, što dovodi do oksidativnog ošteće-

nja biomolekula, poput DNA, proteina i lipida. Posljedično, dolazi do fragmentacije DNA spermatozoida, što negativno utječe na njihovu genetsku stabilnost i sposobnost oplodnje⁸. Prekomjerna konzumacija alkohola povezana je s brojnim zdravstvenim problemima, uključujući i smanjenu plodnost muškaraca. Kod muškaraca s astenozoospermijom, stanjem karakteriziranim smanjenom pokretljivošću spermatozoida, povećan unos alkohola dodatno pogoršava kvalitetu sperme. Jedan od ključnih mehanizama kojim alkohol oštećuje spermatozoide jest povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Acetaldehid, toksični metabolit etanola, reagira s proteinima i lipidima u stanicama spermatogenetske loze, inducirajući peroksidaciju lipida i oštećenje DNA. Osim toga, kod alkoholičara je zabilježen disbalans između prooksidantnih i antioksidantnih sustava, što dovodi do kumulativnog oštećenja stanica i smanjene proizvodnje testosterona⁹. Pušenje je prepoznato kao značajan rizični faktor za razvoj muške neplodnosti. Jedna od ključnih posljedica pušenja jest poremećaj oksidativno-antioksidativnog statusa u testisima, što dovodi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Višak ROS-a oštećuje DNA, proteine i lipide u spermatozoidima, što rezultira smanjenjem njihove pokretljivosti, morfologije i sposobnosti oplodnje. Osim toga, pušenje inducira upalne procese u testisima, manifestirane povećanim brojem leukocita u ejakulatu. Leukociti dodatno pridonose proizvodnji ROS-a, pojačavajući oksidativni stres i oštećenja sperme. Smanjena razina antioksidansa, poput vitamina E i C, kod pušača dodatno pogoršava ovaj disbalans i povećava ranjivost spermatozoida na oksidativno oštećenje⁹. Zračenje koje emitiraju mobilni uređaji pokazalo se štetnim za DNA spermija. Ftalati, koji se nalaze u plastičnim proizvodima korištenim u domaćinstvu i industriji, negativno utječu na spermatogenezu i oštećuju DNA spermija⁹. Zanimljivo je da oksidacijski stres mogu uzrokovati upravo tehnike potpomognute oplodnje. Prilikom fertilizacije *in vitro* i intrauterine inseminacije centrifugiranjem se odvajaju spermiji od sjemenske tekućine. Taj mehanički proces potiče stvaranje oksidacijskog stresa i gubitak antioksidansa. Krioprezervacija spermija također je povezana s povećanom razinom oksidacijskog stresa. U liječenju

malighnih bolesti često se primjenjuje farmakoterapija i postupci koji imaju štetno djelovanje na cijeli organizam, uključujući i reproduktivni sustav. Citostatici poput cisplatine, doksorubicina i ciklofosfamida povezani su s povećanim količinama oksidacijskog stresa, a radioterapija također izaziva oksidacijski stres².

ANTIOKSIDANSI U SJEMENOJ TEKUĆINI

Sjemena tekućina predstavlja složen medij bogat antioksidansima koji imaju ključnu ulogu u održavanju integriteta i funkcije spermatozoida. Antioksidativni sustav sjemene tekućine sastoji se od enzimskih i neenzimskih antioksidansa. Enzimski antioksidansi, poput glutation-peroksidaze, superoksid-dismutaze i katalaze, jesu endogeni enzimi koji se sintetiziraju u prostati i imaju sposobnost neutralizacije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Neenzimski antioksidansi, s druge strane, jesu brojne molekule, uključujući vitamine (E, C), minerale (selen, cink), koenzim Q10 i glutation, koje se uglavnom unose hranom. Brojna su istraživanja potvrdila pozitivan učinak suplementacije antioksidansima na parametre spermograma. Vitamin E, vitamin C, L-karnitin, N-acetilcistein, cink i selen najčešće su proučavani antioksidansi u kontekstu muške plodnosti. Ovi nutrijenti djeluju sinergistički, smanjujući oksidativni stres, poboljšavajući pokretljivost, morfologiju i integritet DNA spermatozoida. Pravilna prehrana, bogata voćem, povrćem, orašastim plodovima, morskim plodovima i cjelovitim žitaricama, može značajno pridonijeti održavanju adekvatnih razina antioksidansa u organizmu i poboljšati plodnost muškaraca^{16,17}.

RASPRAVA

Neplodnost je često povezana s oksidativnim stresom, stanjem koje nastaje kada je sposobnost organizma da neutralizira štetne učinke reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) nadjačana njihovom prekomjernom proizvodnjom⁷. Povećana proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u spermatogenetskoj lozi dovodi do značajnih oštećenja na molekularnoj razini, što se klinički manifestira smanjenjem kvalitete sperme. Stanice spermatogeneze, zbog visokog udjela polinezasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani, izuzetno su osjetljive na li-

pidnu peroksidaciju. Ovaj autokatalitički proces, potaknut ROS-om, dovodi do stvaranja štetnih produkata, poput malondialdehida (MDA), akroleina i 4-hidroksinonenala, koji oštećuju staničnu strukturu i funkcije spermatozoida. Nezrele stanice spermatogeneze i leukociti prisutni u ejakulatu glavni su izvori ROS-a. Za vrijeme spermatogeneze Sertolijeve stanice pružaju zaštitu spermatogonijama i spermatocitima od oksidativnog stresa. Međutim, nakon završetka spermatogeneze i izbacivanja spermija u sjemeni kanalić, spermiji ostaju izloženi oksidativnom stresu bez ove zaštite. Posljedice oksidativnog stresa su brojne i uključuju oštećenje DNA, proteina i lipida, što se manifestira smanjenom pokretljivošću, koncentracijom i morfološkim abnormalnostima spermatozoida⁹. Varikokela, proširene vene na spermatičnoj vrpici, predstavlja jedan od najčešćih uzroka muške neplodnosti. Ključni patofiziološki mehanizam povezan s varikokelom i neplodnošću jest oksidativni stres. Povećana temperatura u skrotumu, uzrokovana varikokelom, i smanjena opskrba kisikom (hipoksija) dovode do poremećaja metaboličkih procesa u testisu. Oštećenje proteina u transportnom lancu elektrona, koje je posljedica ovih poremećaja, rezultira povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i razvojem oksidativnog stresa¹⁴. Infekcije kao što je prostatitis dovode do aktivacije leukocita koji proizvode ROS uzrokujući tako oksidativni stres². Pretiost aktivira sistemski upalni odgovor, čime se povećava otpuštanje porinflatornih citokina koji aktiviraju leukocite i potiču ih na stvaranje ROS-a. Hiperglikemija i inzulinska rezistencija, karakteristične za dijabetes, potiču proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta i induciraju oksidativni stres, što dovodi do oštećenja tkiva testisa i vaskulature, a time i do poremećaja spermatogeneze i erektilne funkcije⁸. Zloupotreba alkohola, pušenje i izloženost okolišnim toksinima, kao što su ftalati i zračenje, predstavljaju značajne rizike za muško reproduktivno zdravlje. Toksični metaboliti alkohola, kao i kemikalije iz duhanskih proizvoda i okoliša, potiču peroksidaciju lipida i proteina u spermatozoidima te povećavaju proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što dovodi do oksidativnog stresa i oštećenja sperme⁹. Antioksidansi su molekule koje neutraliziraju štetne reaktivne kisikove vrste, čime

sprječavaju oštećenje stanica i tkiva uzrokovano oksidativnim stresom. Djelujući kao donori elektrona, antioksidansi stabiliziraju slobodne radikale i prekidaju lančane reakcije oksidacije. Esencijalni su za održavanje stanične homeostaze i zaštitu od brojnih bolesti povezanih s oksidativnim stresom⁵. Enzimski i neenzimski antioksidansi prisutni u spermi djeluju sinergistički kako bi neutralizirali štetne slobodne radikale i održali integritet spermija štiteći genetski materijal i stanične membrane spermatozoida od oštećenja uzrokovanih

Stanice spermatogenetske loze izrazito su osjetljive na djelovanje reaktivnih kisikovih spojeva. Oštećenja na molekularnoj razini klinički se manifestiraju promijenjenim parametrima spermograma.

oksidativnim stresom. Neophodni su za održavanje pokretljivosti, morfologije i sposobnosti spermatozoida za oplodnju¹¹. Uključivanje namirnica bogatih antioksidansima u svakodnevnu prehranu, poput voća, povrća, orašastih plodova i sjemenki, može pridonijeti poboljšanju muške plodnosti. Vitamin C, vitamin E, cink i selen, prisutni u ovim namirnicama, igraju ključnu ulogu u zaštiti spermatozoida od oksidativnog stresa^{16, 17}. Iako su brojna istraživanja pokazala pozitivan učinak pojedinih antioksidansa na plodnost, važno je napomenuti da antioksidansi u organizmu rijetko djeluju izolirano. U prehrani se nalaze u kombinaciji s drugim fitokemikalijama, vitaminima i mineralima, što može pojačati ili umanjiti njihovo djelovanje. Sinergistički učinak različitih komponenti hrane otežava istraživanje i izoliranje utjecaja pojedinih antioksidansa na plodnost, no bioraspoloživost antioksidansa iz hrane varijabilna je i ovisi o brojnim čimbenicima – kao što su način pripreme hrane, istovremeni unos drugih nutrijenata, individualne karakteristike organizma i zdravstveno stanje. Zbog toga je teško odrediti optimalne doze antioksidansa koje bi se koristile u terapiji neplodnosti, a koje bi bile sigurne i učinkovite za sve pojedince¹⁸. Neplodnost je kompleksan problem i potreban je multidisciplinarni pristup. Uz kompleksnost problematike valja uzeti u obzir da je svaki par jedinstven, stoga je važno naglasiti potrebu za individualiziranim

pristupom u liječenju neplodnosti. Preporuke o prehrani i načinu života trebaju biti prilagođene specifičnim potrebama svakog pojedinca. Kontrolu tjelesne težine, prestanak pušenja te ograničavanje unosa alkohola i kontroliranje hiperglikemije u dijabetičara trebalo bi savjetovati parovima koji se liječe od neplodnosti. Zagađenje okoliša, izloženost kemikalijama i teškim metalima mogu povećati oksidativni stres i negativno utjecati na plodnost. Sve veći broj istraživanja pokazuje da crijevni mikrobiom može utjecati na plodnost. Neravnoteža u crijevnoj flori može dovesti do upala i poremetiti hormonsku ravnotežu¹². Stres, anksioznost i depresija mogu negativno utjecati na plodnost. Stoga je važno pružiti psihološku podršku parovima koji se suočavaju s problemima plodnosti⁵. Od presudne je važnosti održavati finu ravnotežu između reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i antioksidativne obrane u spermijima. Molekule ROS neophodne su za normalno funkcioniranje spermija, ali u prevelikim količinama mogu uzrokovati oksidativni stres. Ovaj stres, koji se javlja kada antioksidansi nisu u stanju neutralizirati sve štetne radikale, može dovesti do oštećenja DNA, proteina i lipida u spermijima. Posljedično, može doći do smanjenja pokretljivosti spermija, fragmentacije DNA i drugih promjena koje mogu uzrokovati mušku neplodnost. Pravilna prehrana bogata voćem, povrćem, orašastim plodovima i sjemenkama, koje su izvor brojnih antioksidansa, igra ključnu ulogu u očuvanju muške plodnosti. Antioksidansi poput vitamina C, E, selena i cinka djeluju kao zaštitnici spermija neutralizirajući štetne slobodne radikale. Nedovoljan unos antioksidansa može dovesti do povećanog oksidativnog stresa, što oštećuje spermatozoide na genetskoj, epigenetskoj, lipidnoj i proteinskoj razini. Posljedice ovakvog oštećenja mogu biti smanjena pokretljivost spermija, povećana fragmentacija DNA i, u konačnici, neplodnost¹⁹.

ZAKLJUČAK

Oksidativni stres, uzrokovan neravnotežom između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i antioksidativne obrane, predstavlja ključni patofiziološki mehanizam u etiologiji muške neplodnosti. Molekule ROS, iako nužne za normalno funkcioniranje spermija, u prekomjernoj količini

oštećuju DNA, proteine i lipide u spermijima, što rezultira smanjenom pokretljivošću, morfološkim abnormalnostima i, konačno, neplodnošću. Različiti čimbenici, uključujući infekcije, upale, metaboličke poremećaje (npr. dijabetes), izloženost toksičnim tvarima i neke terapije, mogu pojačati oksidativni stres. Liječenje osnovnih uzroka oksidativnog stresa, usvajanje zdravih životnih navika i, u nekim slučajevima, primjena antioksidativne terapije mogu značajno poboljšati plodnost muškaraca. Međutim, s obzirom na kompleksnost muške neplodnosti, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjeli svi mehanizmi koji dovode do neplodnosti i kako bi se razvili personalizirani pristupi liječenju.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju kako ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Gršković A, Dimec D. Sterilitet. In: Fučkar Ž, Španjol J (eds). *Urologija II*. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2013;271-287.
- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2008;14. [cited 2023 Jun 6]. Available from: <https://academic.oup.com/humupd/article/14/3/243/683505>.
- Murray RK. Harperova ilustrirana biokemija. 28th Edition. Zagreb: Medicinska naklada, 2011.
- Santoro A, Chianese R, Troisi J, Richards S, Nori SL, Fasano S et al. Neuro-toxic and Reproductive Effects of BPA. *Curr Neuropharmacol* 2019;17:1109–1132.
- Cescon M, Chianese R, Tavares RS. Environmental impact on male (In)fertility via epigenetic route. *J Clin Med* 2020;9:2520.
- O'Flaherty C, Matsushita-Fournier D. Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. *Biol Reprod* 2017;97:577–585.
- Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. *Int J Reprod Biomed* 2016;14:231-240.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1-17.
- 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;16. [cited 2023 Jun 19]. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/16/9/1922/2915893-?login=false&fbclid=IwAR1WlQjq3RI0k4IVcOL2DegzyTikZ2ewZlytenkDiQ4YXlIKDy0avlmzLqQ>.
- 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* 2021;19:493–504.
- Sharma P, Ghanghas P, Kaushal N, Kaur J, Kaur P. Epigenetics and oxidative stress: A twin-edged sword in spermatogenesis. *Andrologia* 2019;51:13432.
- Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008;266:6–11.
- Urduingio RG, Bayón GF, Dmitrijeva M, Toraño EG, Bravo C, Fraga MF et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod* 2015;30:1014–1028.
- Wang K, Gao Y, Wang C, Liang M, Liao Y, Hu K. Role of Oxidative Stress in Varicocele. *Front Genet* 2022;13:850114.
- Alahmar A. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *J Hum Reprod Sci* 2019;12:4-18.
- Kowalczyk A. The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. *Reprod Sci* 2021;29:1387–1394.
- Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczek J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol* 2013;66:60–67.
- 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)* 2021;10:241.
- Chianese R, Pierantoni R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants* 2021;10:92.