

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Biljana M. Macanović

**EFEKAT MIMETIKA SUPEROKSID
DISMUTAZE NA MITOHONDRIJALNI I
FUNKCIONI STATUS HUMANIH
SPERMATOZOIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Biljana M. Macanović

**THE EFFECT OF SUPEROXIDE
DISMUTASE MIMIC ON
MITOCHONDRIAL AND FUNCTIONAL
STATE OF HUMAN SPERMATOZOA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

MENTORI:

dr Aleksandra Korać

redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

dr Vesna Otašević

viši naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Sanković“, Univerzitet u Beogradu.

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Bato Korać

vanredni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu.

dr Eliana Garalejić

vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.

DATUM ODBRANE

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Ginekološko akušerskoj klinici „Narodni front“ u Beogradu, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu i Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Rad je realizovan u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije broj 173054, pod rukovodstvom dr Vesne Otašević, višeg naučnog saradnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“.

Ovom prilikom želim da izrazim posebnu zahvalnost:

Prvenstveno profesorki dr Aleksandri Korać, mentoru i nadasve posebnoj osobi i nežnoj dami koja mi je otvorila vrata i pružila ruku nade kada su mi sva vrata bila zavorena. Zahvaljujem se na beskrajnom strpljenju, podsticanju, podršci kao i poverenju tokom izrade teze. A posebno na bezrezervnom razumevanju koje je doprinelo uspešnom završetku rada.

Zahvaljujem se dr Vesni Otašević, pre svega dobrom drugu i učitelju, na mentorstvu, beskrajnom optimizmu, upornosti, istrajnosti kao i dragocenoj stručnoj i tehničkoj pomoći tokom izrade teze. Hvala na ogromnoj pomoći, svim savetima, predusretljivosti, razumevanju kao i dostupnosti i posvećenosti poslu do krajnjih mogućnosti.

Zahvaljujem se profesoru dr Bati Koraću na saradnji, strpljenju, nesebičnoj pomoći i korisnim savetima, kao i na dragocenoj stručnoj i tehničkoj pomoći tokom uobličavanja ove teze. Zahvaljujem se na stručnim i zanimljivim predavanjima tokom kojih sam se upoznala sa svetom redoks regulacije.

Zahvaljujem se profesorki dr Eliani Garalejić, mojoj načelnici, našoj i mojoj Eli, na ukazanom poverenju, podršci, utehi i rečima ohrabrenja u teškim životnim i profesionalnim trenucima. Hvala i za podstrek i stvaranje uslova za realizaciju praktičnog dela disertacije.

Zahvaljujem kolegama sa Biološkog fakulteta: dr Kseniji Veličković, Igoru Goliću, dr Milici Markelić na razumevanju i pomoći tokom eksperimentalnog rada. Zahvaljujem kolegama sa IBISS-a, dr Milici Vučetić, dr Biljani Buzadžić, dr Aleksandri

Janković na saradnji, stručnoj i tehničkoj pomoći tokom dobijanja rezultata teze, kao i dr Ani Stančić na dragocenoj stručnoj i tehničkoj pomoći tokom uobličavanja disertacije.

Zahvaljujem se svim svojim vrednim biolozima Odeljenja ART na podršci i pomoći i toploj čovečnoj reči u vreme izrade teze.

Hvala i glavnoj sestri Odeljenja ART Suzani Mijajlović na konstruktivnoj saradnji i pravilnom usmeravanju medicinskih sestara na безусловnu tehničku saradnju tokom prikupljanja uzoraka za eksperimente.

Dr Milošu R. Filipoviću i dr Ivani Ivanović Burmazović na stručnoj i tehničkoj podršci - bez njih ne bismo imali mimetik.

Miliji koji mi je 1994. godine preusmerio misli ka nauci prošlosti, sadašnjosti i budućnosti - nauci o nedokučivom svetu koji nas okružuje.

Mojoj porodici i prijateljima koji su me tešili i hrabрили u kritičnim momentima i neuspesima a radovali se mojim uspesima.

HVALA mojima Jovani i Mihajlu..... što nisu imali mamu koliko su želeli i zaslužili.

Ogromnu zahvalnost dugujem svom suprugu i najodanijem prijatelju, Mirku Macanoviću, na glasu razuma, beskrajnoj podršci i svojoj ljubavi.

U Beogradu, 05.07.2015.

Biljana Macanović

*Ovaj rad posvećujem svojim dobrim roditeljima, ćerki Jovani, sinu Mihajlu, kao i nauci
i svim ljudima kojima bi naš rad i trud mogao da pomogne u rešavanju njihovih životnih
i zdravstvenih problema*

EFEKAT MIMETIKA SUPEROKSID DISMUTAZE NA MITOHONDRIJALNI I FUNKCIONI STATUS HUMANIH SPERMATOZOIDA

REZIME

Neplodnost je globalni problem u svetu. Uzroci i frekvenca različitih oblika neplodnosti variraju, a novije studije pokazuju da reaktivne vrste kiseonika (ROS) i azota (RNS), superoksid ($O_2^{\cdot-}$) i azot oksid (NO) pre svega, igraju važnu ulogu, posebno kod neplodnosti muškaraca. Pokazano je da su mitohondrije ne samo mesto visoke produkcije reaktivnih vrsta, već organele od čijeg funkcionog statusa zavisi, odnosno sa njim pozitivno korelira, fertilizacioni potencijal i kvalitet humanih spermatozoida. Međutim, molekulska osnova delovanja ROS/RNS na funkcionost spermatozoida, posebno na funkcioni status mitohondrija, još uvek je nepoznata.

Cilj doktorske disertacije je da se ispituju efekti modulacije redoks statusa spermatozoida na ključne parametre koji determinišu funkcioni status, odnosno aktivnost mitohondrija, kao i kvalitet spermatozoida, podjednako na molekulskom i strukturnom nivou.

Iz tih razloga, redoks status spermatozoida je specifično moduliran pentaazamakrocikličnim Mn(II) mimetikom SOD (*engl.* superoxide dismutase), M40403, koji selektivno uklanja $O_2^{\cdot-}$ i indirektno modulira bioraspoloživost NO. U cilju rasvetljavanja signalnih puteva regulacije fertilizacionih procesa, naročito eventualnog uticaja NO na poboljšanje funkcionog statusa mitohondrija i fertilizacionih svojstava spermatozoida, ispitivali su se sledeći parametri: pokretljivost spermatozoida, koncentracija NO elektrohemijski, korišćenjem NO specifične elektrode, kao i korišćenjem fluorescentne probe specifične za NO (Daf2-DA, diamino-fluorescein-2-acetat); lokalizacija produkcije NO u spermatozoidima; endogena produkcija NO praćenjem ekspresije izoformi NOS (*engl.* NO synthase) – endotelske (eNOS), neuronalne i inducibilne; enzimi ključni za produkciju $O_2^{\cdot-}$ (NADPH oksidaza) i njegovo uklanjanje (CuZnSOD, *engl.* cooper zink SOD i MnSOD, *engl.* manganese SOD); ekspresija enzima odgovornih za uklanjanje H_2O_2 , nastalog aktivnošću SOD i SOD mimetika, katalaze i GSH-Px (*engl.* glutathione peroxidase); mitohondrijalna

dinamika i metabolički status, praćenjem mitohondrijalnog membranskog potencijala (katjonska fluorescentna proba Mitotracker Green FM) i ekspresija kompleksa oksidativne fosforilacije (kompleks I, kompleks III, kompleks IV, citohrom *c*, citohroma *b* i ATP sintaza). Pored toga ispitivani su osnovni parametri semene plazme i spermatozoida, kao i korelacija sa nivoom enzima antioksidativne odbrane u semenoj plazmi.

U disertaciji su korišćeni spermatozoidi normospermičnih pacijenata. Prečišćeni spermatozoidi su podeljeni u tri eksperimentalne grupe. Prva grupa je resuspendovana u Tirodovom medijumu i ispitivana odmah (kontrola), dok su druga (resuspendovana u Tirodovom medijumu) i treća (resuspendovana u Tirodovom medijumu koji sadrži 50 μ M M40403) ispitivane nakon inkubacije od tri časa. Vreme i uslovi inkubacije su identični onima koji se koriste tokom obrade spermatozoida za fertilizaciju *in vitro* (IVF). Pre ispitivanja spermatozoida, čistoća uzorka je ispitivana i potvrđena svetlosnom mikroskopijom i odsustvom amplifikacije iRNK za specifične markere germinativnih ćelija, epitelskih ćelija i leukocita.

Rezultati disertacije pokazuju da primena SOD mimetika poboljšava funkcioni kapacitet spermatozoida, posebno energetski, vezan za mitohondrijalnu aktivnost. Naime, inkubacija spermatozoida u Tirodovom medijumu (tri sata pod nekapacitirajućim uslovima) praćena je smanjenjem pokretljivosti spermatozoida. Pri istim uslovima, tretman SOD mimetikom restaurira pokretljivost spermatozoida, kao jedan od ključnih parametara kvaliteta spermatozoida za IVF. Paralelno tome, posle inkubacije spermatozoida u Tirodovom medijumu dolazi do smanjenja količine NO u medijumu, dok mimetik ne samo da rastaurira nivo NO već je njegova koncentracija iznad nivoa u poređenju sa kontrolnim spermatozoidima (pre inkubacije). U skladu sa tim, uočeno je da se populacija Daf2-DA pozitivnih spermatozoida povećava pri tretmanu sa M40403. Uz to, SOD mimetik indukuje povećanje ekspresije iRNK za eNOS. Stoga se može zaključiti da SOD mimetik, M40403, modulira redoks status u spermatozoidima, posebno NO-zavisni, delujući ne samo na povećanje NO biodostupnosti usled smanjenja koncentracije $O_2^{\cdot-}$, već i na indukciju njegove endogene sinteze. SOD mimetik direktno afektuje funkcioni status mitohondrija spermatozoida održavanjem populacije Mitotracker Green FM pozitivnih ćelija na kontrolnom nivou. Takvi spermatozoidi tokom asistirane reprodukcije imaju veći fertilizacioni potencijal.

Na molekulskom nivou to se ogleda u tome što SOD mimetik dovodi do restauracije ekspresije nukleusno kodiranih subjedinica kompleksa I (Ndufa6) i IV (COX IV, *engl. cytochrome c oxidase*) elektron transportnog lanca mitohondrija. SOD mimetik takođe indukuje povećanje genske ekspresije MnSOD i katalaze. Sinhronizovanje puta uklanjanja $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 SOD mimetikom važno je za održavanje ukupnog redoks stanja u spermatozoidima.

Ispitivanje parametara antioksidativne odbrane u semenoj plazmi pokazuje da postoji korelacija sa parametarima kvaliteta spermatozoida i da se oni mogu koristiti kao potencijalni biomarkeri u analizi kvaliteta spermatozoida.

SOD mimetik predstavlja relevantno farmakološko sredstvo u terapiji neplodnosti kod muškaraca preko poboljšanja funkcionalnih parametara spermatozoida i njihove mitohondrijalne aktivnosti. Njegova primena može biti dobra strategija u asistiranju fertilizaciji, kao i tretiranja subfertilnih (infertilnih) stanja koja se karakterišu oštećenjima mitohondrija i/ili izmenjenim redoks statusom spermatozoida.

KLJUČNE REČI: SOD mimetik, mitohondrije, humani spermatozoid, azot oksid, eNOS, antioksidativna odbrana, semena plazma, fertilizaciona sposobnost spermatozoida, neplodnost

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

UDK BROJ: [577.151.7:615.256.4]:612.616.2

THE EFFECT OF SUPEROXIDE DISMUTASE MIMIC ON MITOCHONDRIAL AND FUNCTIONAL STATE OF HUMAN SPERMATOZOA

ABSTRACT

Infertility is a global problem worldwide. The frequency and origin of different forms of infertility vary, but recent studies showed that reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), first of all, superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and nitric oxide (NO), play an important role, especially in male infertility. It has been shown that mitochondria play essential role in regulation of reactive species production. Moreover, mitochondrial functional status in spermatozoa positively correlates with fertilizing potential and quality of human sperm. However, the molecular basis of ROS/RNS action on sperm functionality, especially on the functional status of sperm mitochondria, is still unknown.

The aim of the dissertation was to examine the effects of redox status modulation in human spermatozoa on the key parameters determining functional status (activity) of mitochondria and sperm quality, at the molecular and structural levels.

The redox status of the sperm is specifically modulated using pentaazamacrocyclic Mn(II) mimic SOD (*eng.* superoxide dismutase), M40403, that selectively removes $O_2^{\cdot-}$ and indirectly modulates the bioavailability of NO. In order to shed more light on the signalling pathways underlying fertilizing processes, particularly possible beneficial effects of NO on mitochondria functional status and sperm fertilizing properties, the following parameters were examined: sperm motility; concentration of NO, electrochemically, using NO specific electrodes, as well as using fluorescent probes specific for NO (Daf2-DA, fluorescein-diamino-2-acetate); localization of NO production in the spermatozoa; endogenous NO production by determining the expression of NOS isoforms (NO synthase) – endothelial (eNOS), neuronal and inducible; enzymes essential for production of $O_2^{\cdot-}$ (NADPH oxidase) and its removing (CuZnSOD, copper zinc SOD and MnSOD, manganese SOD); expression of enzymes removing H_2O_2 , generated by activity of SOD and SOD mimic, catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px); mitochondrial dynamic and metabolic status, using cationic fluorescent probe Mitotracker Green FM for monitoring mitochondrial membrane

potential and finally the expression of complexes of the oxidative phosphorylation (Complex I, Complex III, Complex IV, cytochrome *c*, cytochrome *b* and ATP synthase). Besides, basic parameters of the seminal plasma and sperm, as well as their correlation with the level of antioxidant enzymes, were determined.

To do this, sperm of normozoospermic patient were used in this dissertation. Purified spermatozoa were divided into three experimental groups. The first group was resuspended in Tyrode's medium and tested immediately (control), while the second (resuspended in Tyrode's medium) and the third (resuspended in Tyrode's medium containing 50 μ M M40403) groups were examined after incubation of three hours. Time and incubation conditions are identical to those for the processing of sperm for *in vitro* fertilization (IVF). Before sperm examinations, the purity of the sample was tested and confirmed by light microscopy and the absence of amplification of mRNA for specific markers of germ cells, epithelial cells and leukocytes.

The results of the thesis show that treatment with SOD mimic improves the functional capacity of spermatozoa, especially related to mitochondrial energy state. The incubation of spermatozoa in Tyrode's medium (three hours under non-capacitating conditions) leads to decrease in sperm motility. In the same conditions, the treatment of SOD mimic restores sperm motility, as one of the key parameters of sperm quality for IVF. In parallel, incubation of spermatozoa in Tyrode's medium induces decrease of NO level in the medium, while SOD mimic restores and evenmore increases it compared to control sperm (before incubation). Accordingly, the population of Daf2-DA positive spermatozoa is increased after M40403 treatment. In addition, the SOD mimic induces the increase of eNOS iRNK expression. Thus, it seems likely that SOD mimic, M40403, modulates the redox environment in spermatozoa, especially NO-dependent, not only by increasing NO bioavailability, due to removing $O_2^{\bullet-}$, but also upregulating its endogenous synthesis. Moreover, SOD mimic directly leads to maintaining of mitochondrial functional state in spermatozoa, since it restores population of Mitotracker Green FM positive cells at the control level. Such spermatozoa have a higher fertilizing potential during assisted reproduction. In line with this are M40403-stimulated changes at mitochondria molecular level. Namely, SOD mimic induces restoration of the iRNK expression of nucleus encoded subunits of complex I (Ndufa6) and IV (COX IV, *eng.* cytochrome *c* oxidase) of mitochondrial

electron transport chain. SOD mimic increases the gene expression of MnSOD and catalase, as well. Such coordinated upregulation of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 removing enzymes is important to maintain the overall redox state of spermatozoa.

Our results also show that there is correlation between components of antioxidant defence in seminal plasma with sperm quality parameters and thus they can be used as potential biomarkers in the analysis of sperm quality.

These results suggest that M40403 can be promising pharmacological tool in the treatment of male infertility acting beneficially on mitochondrial activity and functional parameters of spermatozoa. Using of SOD mimic can be a good strategy in assisted fertilization, as well as treatment of infertile states accompanied by mitochondrial impairments and/or disturbed sperm redox state.

KEY WORDS: SOD mimic, mitochondria, human spermatozoa, nitric oxide, eNOS, antioxidative defence, seminal plasma, sperm fertilizing capacity, infertility

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Cell and Tissue Biology

UDK No: [577.151.7:615.256.4]:612.616.2

SADRŽAJ

Uvod	1
1.1. Muški reproduktivni sistem	1
1.2. Građa i sazrevanje spermatozoida	2
1.3. Mitohondrije spermatozoida	4
1.4. Redoks regulacija – uloga ROS i RNS u reprodukciji	9
1.5. NO kao signalni molekul u fertilizaciji	11
1.6. Enzimi antioksidativne odbrane spermatozoida	15
1.7. Primena SOD mimetika u medicini	17
1.8. Sastav i značaj semene plazme za funkcionalnost spermatozoida	19
2. Cilj	22
3. Materijal i metodi	24
3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka	24
3.2. Određivanje pokretljivosti spermatozoida	26
3.3. Merenje koncentracije NO u spermatozoidima	26
3.3.1. Elektrohemijsko određivanje količine NO	26
3.3.2. Određivanje količine NO kvantifikacijom Daf2-DA pozitivnih spermatozoida	26
3.4. Bojenje mitohondrija spermatozoida MT-G	27
3.5. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (<i>engl.</i> real time polymerase chain reaction, RT-PCR)	27
3.6. Western blot	30
3.6.1. Određivanje količine proteina za Western blot	30
3.6.2. Elektroforeza proteina	30
3.6.3. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blot)	31
3.6.4. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom	32
3.7. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane u semenoj plazmi	33
3.7.1. Određivanje količine proteina u semenoj plazmi	33
3.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	33
3.7.3. Određivanje aktivnosti katalaze	33
3.7.4. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze	34
3.7.5. Određivanje aktivnosti glutacion S-transferaze	34
3.8. Statistička obrada rezultata	34

4. Rezultati	35
4.1. Karakteristike nativnih uzoraka semena za analizu spermatozoida	35
4.1.1. Rezultati ispitivanja čistoće uzoraka spermatozoida upotrebljenih u eksperimentima	35
4.2. Pokretljivost spermatozoida	36
4.3. Količina NO u spermatozoidima	36
4.3.1. Nivo NO određen elektrohemijski	36
4.3.2. Količina NO određena kvantifikacijom Daf2-DA pozitivnih spermatozoida	37
4.4. Funkcioni status mitohondrija	38
4.5. Rezultati RT-PCR analiza	39
4.5.1. Genska ekspresija komponenti OXPHOS	39
4.5.2. Genska ekspresija eNOS i NOX	42
4.5.3. Genska ekspresija enzima antioksidativne odbrane	43
4.6. Rezultati Western blot analize	45
4.6.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS	45
4.6.2. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane	47
4.7. Ispitivanja semene plazme	48
4.7.1. Karakteristike uzoraka semena za analize semene plazme	48
4.7.2. Korelacija između funkcionalnih parametara spermatozoida (broj, progresivna pokretljivost i morfologija) i ekspresije/aktivnosti proteina antioksidativne odbrane u semennoj plazmi	49
5. Diskusija	51
6. Zaključci	59
7. Literatura	61

1. Uvod

Jedan od najozbiljnijih problema današnjice u svetu i kod nas, sa kojim se susreću parovi u reproduktivnom dobu jeste neplodnost (sterilitet). Neplodnost pogađa približno 10-15% populacije širom sveta i u porastu je u poslednjoj deceniji. Globalno, jedan od šest do sedam parova širom sveta trenutno ima nekih poteškoća sa začećem (Sharma i sar., 2013). Iako frekvencija i uzrok neplodnosti nisu potpuno okarakterisani, približno 40% slučajeva može se pripisati muškom faktoru, drugih 40% ženskom, a 20% se vezuje za kombinovane probleme oba pola (Sharlip i sar., 2002).

Od kada je zabeleženo rođenje prve bebe začete *in vitro*, "bebe iz epruvete", 1978. godine, asistiranje reproduktivne tehnike se ubrzano razvijaju i danas obuhvataju veliki broj metoda za ostvarivanje trudnoće na veštački način i tretman steriliteta (Kamel, 2013). Ove metode podrazumevaju manipulaciju gametima, uključujući IVF (*engl. in vitro fertilization*) i ICSI (*engl. intracytoplasmic sperm injection*), intrauterinu inseminaciju homolognim ili donorskim semenom, donaciju jajnih ćelija i zamrzavanje embriona. Dramatičan napredak tehnika koje se koriste u IVF doveo je da se trenutni procenat uspešnosti procedure, zasnovane na stopi kliničkih trudnoća, kreće od skromnih 25% do visokih 60%. Do danas je u svetu na ovaj način rođeno oko pet miliona beba.

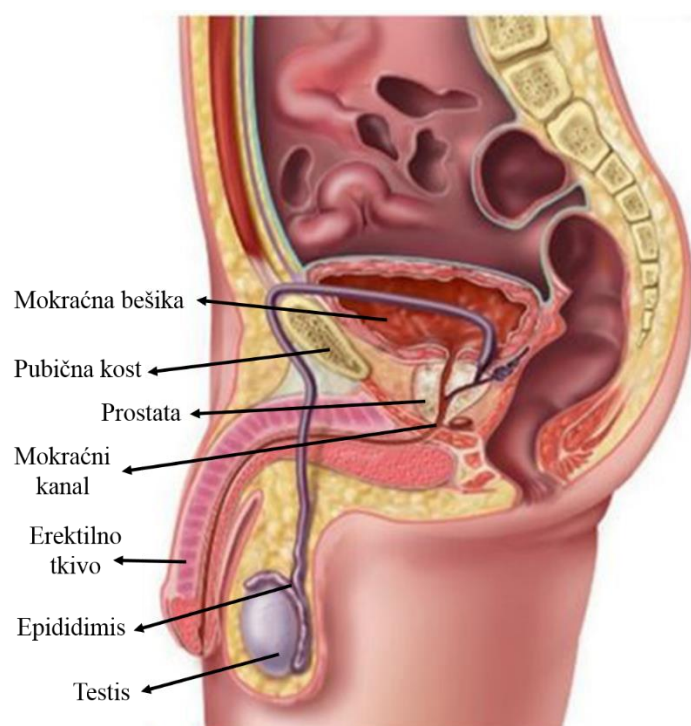
Veliki broj faktora koji uzrokuju neplodnost može biti uspešno prevaziđen nekom od metoda asistiranje reprodukcije, i najčešće je za parove to jedini mogući put do roditeljstva. U osnovi povećanja prevalencije neplodnosti najčešće leže moderan način života, socijalni faktori i/ili faktori životne sredine. Na žalost, i pored stalnog unapređenja tehnika u medicini, sterilitet je u daljem porastu.

Upravo iz tih razloga jedan od najintrigantnijih biomedicinskih pravaca danas jeste razvoj novih terapijskih pristupa u cilju poboljšanja fertilizacionog potencijala i ostvarivanja potomstva, bilo spontano ili metodima asistiranje reprodukcije.

1.1. Muški reproduktivni sistem

Za stvaranje novih jedinki potrebni su muški i ženski reproduktivni sistem, gemetogeneza i gameti. Muški reproduktivni sistem se sastoji od više organa koji omogućavaju razvoj i sazrevanje muških polnih ćelija (spermatozoida) kao i

deponovanje u ženski reproduktivni sistem (Slika 1). On takođe ostvaruje endokrinu funkciju – sintezu i lučenje muških polnih hormona (Meniru, 2004). Spermatozoidi se formiraju u zidu semenih kanalića, u parnim organima, testisima (semenicima) smeštenim u skrotumu (mošnice). Neposredno uz testis nalazi se jako izuvijan kanal – epididimis, koji se nastavlja u drugi *ductus deferens*. Završni deo ovog kanala je *ductus ejaculatorius* (ejakulatorni kanal), kojim se sperma ubacuje u uretru (mokraćni kanal), a iz nje izbacuje van organizma/ubacuje u ženski polni sistem. Uz ove kanale nalaze se i žlezde: semena kesica, prostata i bulbouretralna žlezda čiji sekreti ulaze u sastav sperme. U ovaj sistem ulazi i muški polni organ – penis (Meniru, 2004).

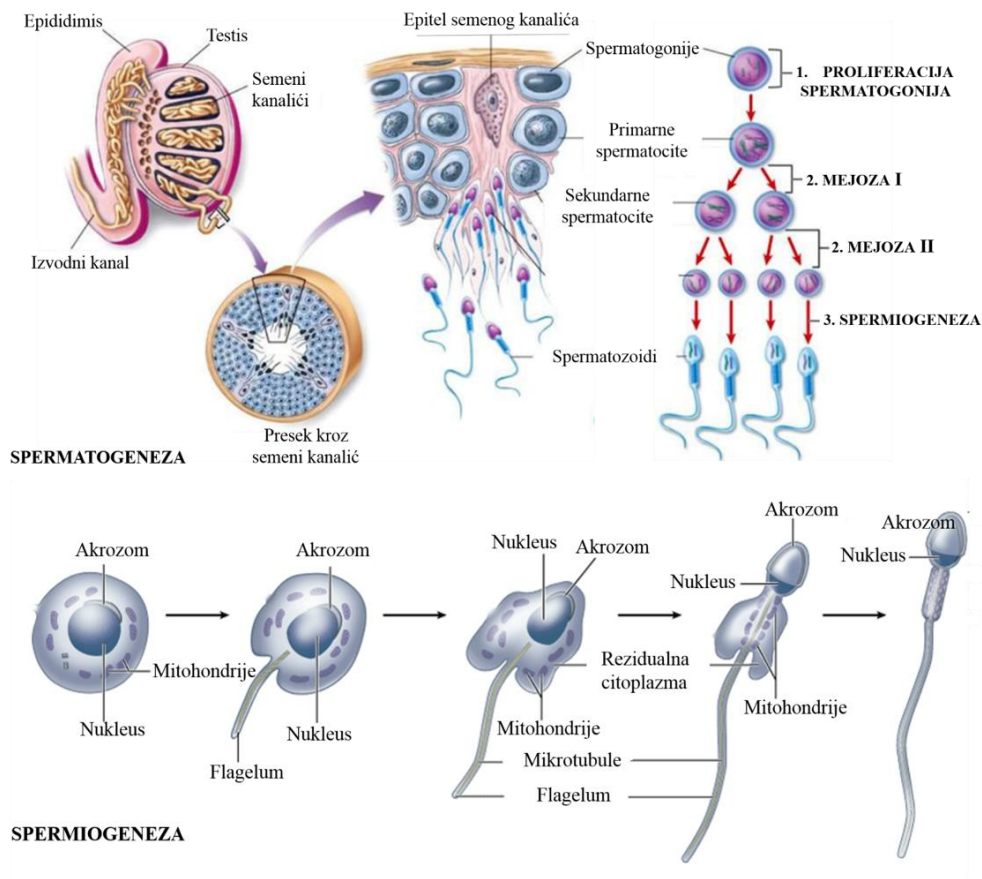


Slika 1. Šematski prikaz muškog reproduktivnog sistema, preuzeto i prerađeno iz Medicine Net. Inc. 2005.

1.2. Građa i sazrevanje spermatozoida

Fertilizaciono sposoban muški gamet – zreo spermatozoid, je haploidna, visoko diferencirana i specijalizovana ćelija osposobljena da prenese nasledni materijal sledećoj generaciji jedinki. Spermatozoid se formira procesom spermatogeneze koja traje oko 64 dana (ukupno oko 74 dana uključujući proliferaciju spermatogonija) (Richard i Kristin, 2013). Proces spermatogeneze se može podeliti u tri faze (Slika 2), a

svaka faza je povezana sa specifičnim tipom germinativnih ćelija – prekursorskih ćelija gameta: 1. proliferacija spermatogonija (spermatocitogeneza); 2. redukciona deoba spermatocita (mejoza I i mejoza II) i 3. diferencijacija spermatida u spermatozoide (spermiogeneza) (Elder i Dale, 2011).

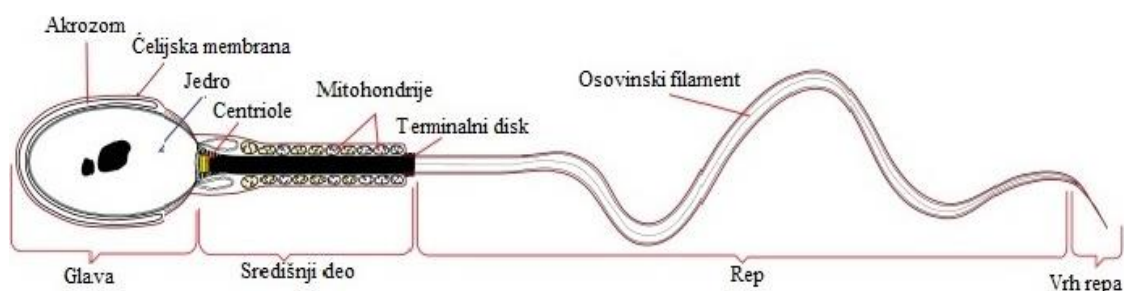


Slika 2. Šematski prikaz spermatogeneze i spermiogeneze.

Sama struktura spermatozoida obuhvata glavu, vrat, središnji region i flagelarni aparat – rep spermatozoida (Slika 3). Glava spermatozoida je ovalnog oblika, prosečne dužine 5 μm i širine 2.5-3.5 μm . Centralni deo glave zauzima nukleus (jedro), a u proksimalnom delu, u vidu kape, nalazi se akrozom koji sadrži proteolitičke enzime neophodne za penetraciju oocite. Vrat je dugačak oko 1 μm i isto toliko širok.

Dužina središnjeg regiona iznosi 5-7 μm , a širina 1 μm . U njemu su smešteni centriolarni par, bliže nukleusu, a celom njegovom dužinom spiralno su raspoređene mitohondrije (Meniru, 2004). Oslonac mitohondrijalnom omotaču na aksonemu čini submitohondrijalna mreža – kompleks vlakana (filamenata) koji podržavaju

organizaciju mitohondrija (Olson i Winfrey, 1990). Rep omogućava pokretljivost spermatozoida. Približno je dugačak 45-50 μm , debeo nešto manje od pola mikrometra, i postepeno se stanjuje prema završnom delu.



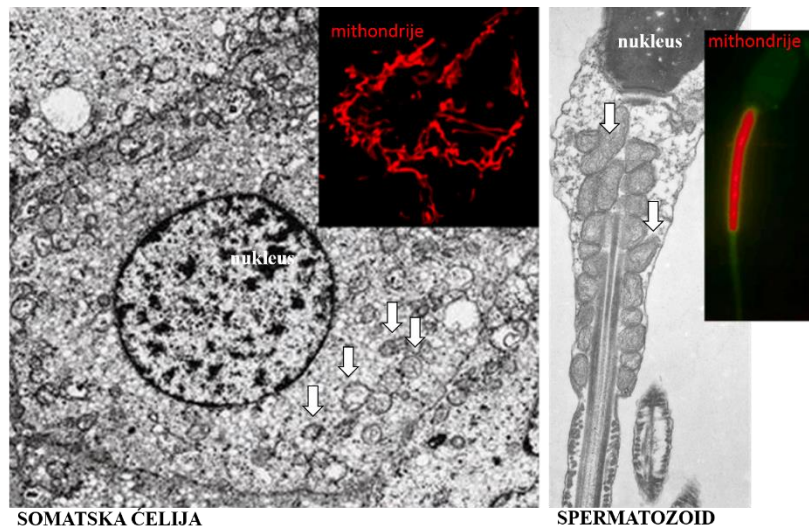
Slika 3. Šema građe humanog spermatozoida, preuzeto i prerađeno iz Jennifer Kersey E-Portfolio.

Kao što je već pomenuto, humani spermatozoid je ćelija sa dragocenim porukom, očinskom DNK, koju treba da isporuči jajnoj ćeliji da u biološkom smislu omogući ostvarivanje potomstva, odnosno produžetak i opstanak vrste.

Spermatozoid nakon spermatogeneze nije odmah sposoban za oplodjenje (fertilizaciju). U semenim kanalićima spermatozoidi su nepokretni i u grupama bivaju potiskivani iz delova izvodnih kanalića. Tada, grupisani u sekretu epididimisnog kanala, lagano se kreću i potrebno im je oko 20 dana da pređu ovaj kanal dug 4-6 metara. Tokom ovog perioda spermatozoidi progresivno sazrevaju (prvi stepen sazrevanja – maturacije), postaju pokretljivi i sposobni za oplodjenje. Oni će potpuno sazreti tek u ženskom reproduktivnom sistemu (drugi stepen sazrevanja), prolaskom kroz ženske polne kanale u kojima dolazi do promena koje predstavljaju ključne predfaktore uspešnog oplodjenja.

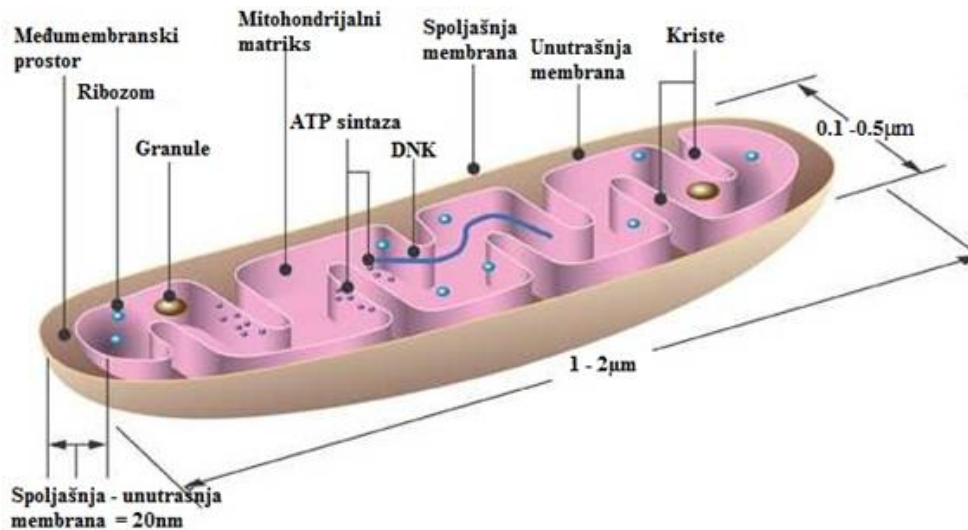
1.3. Mitohondrije spermatozoida

Spermatozoidi se morfološki razlikuju od somatskih ćelija i po tome što su njihove mitohondrije i najveći deo citoplazme locirani u središnjem regionu ćelije (Slika 4). Možemo govoriti o spermatozoidnom tipu mitohondrija koje pokazuju posebne karakteristike i značajno se razlikuju, strukturno i funkciono, od mitohondrija somatskih ćelija.



Slika 4. Lokalizacija mitohondrija u somatskoj ćeliji i spermatozoidu, transmisivna elektronska i fluorescentna (inseti) mikroskopija.

Mitohondrije (Slika 5) su organele koje imaju fundamentalnu ulogu u ćeliji. Kao „energetske centrale“, predstavljaju centralno mesto za ATP produkciju i upravo zato se disfunkcija mitohondrija povezuje sa različitim patofiziološkim stanjima, uključujući i sterilitet (Wallace, 1999). Promene u strukturi mitohondrija su u korelaciji sa njihovim oksidativnim kapacitetom i metaboličkom aktivnošću.

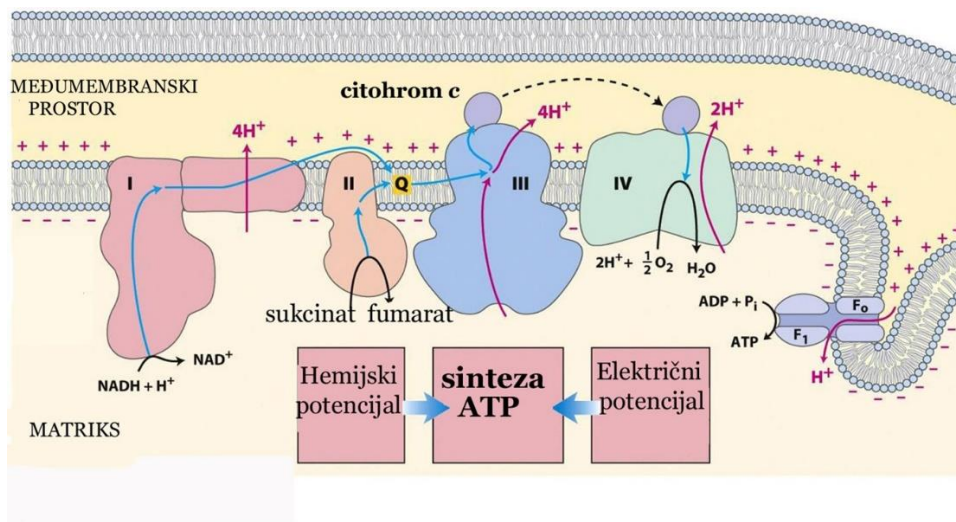


Slika 5. Šematski prikaz građe mitohondrija (preuzeto i prerađeno sa bhavanajagat.com).

Skoro sve ćelije aerobnih organizama vrše oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS). Ovaj put je toliko rasprostranjen jer se u poređenju sa glikolitičkim procesom, na

najefikasniji način oslobođena energija oksidacije goriva konzervira u vidu ATP. Tokom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, elektroni se prenose sa donora elektrona (NADH i FADH₂) na akceptore elektrona. Terminalni akceptor elektrona je kiseonik, čijom četvero-elektronskom redukcijom nastaje voda. Postoje četiri glavna proteinska kompleksa respiratornog lanca unutrašnje mitohondrijalne membrane duž kojeg se odvija egzogeni protok elektrona do kiseonika (Slika 6). To su: NADH dehidrogenaza – kompleks I, sukcinat dehidrogenaza – kompleks II, ubihinon citohrom c oksidoreduktaza – kompleks III i citohrom c oksidaza (COX) – kompleks IV.

Pored ova četiri kompleksa, važnu ulogu u transferu elektrona ima citohrom *c* koji se nalazi u međumembranskom prostoru mitohondrija, asociran sa spoljašnjom stranom unutrašnje membrane mitohondrija. Njegova hem grupa prihvata jedan elektron od kompleksa III. Redukovani citohrom *c* se pomera, oksidujući se na nivou kompleksa IV, predajući mu elektrone. Oslobođena energija prolaskom elektrona kroz elektron transportni lanac (ETL) se koristi za endergeni transport protona iz matriksa u međumembranski prostor mitohondrija. Kompleks I, III i IV ujedno predstavljaju protonske pumpe koje izmeštaju 10 protona (4+4+2) po paru elektrona u međumembranski prostor mitohondrija. Na ovaj način energija se konzervira u vidu elektrohemijskog gradijenta koji predstavlja proton pokretačku snagu za sintezu ATP, katalizovanu ATP sintazom, kada se protoni vraćaju nazad u matriks. ATP sintaza se sastoji iz dve subjedinice: F₀, koja predstavlja integralni protein unutrašnje mitohondrijalne membrane i F₁, koja katalizuje sintezu ATP.



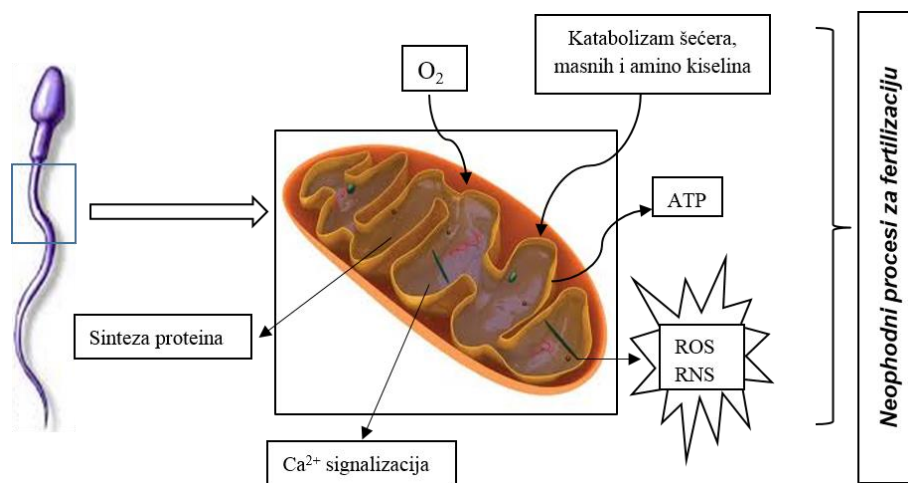
Slika 6. Šematski prikaz oksidativne fosforilacije u mitohondrijama.

Mitohondrije su multifunkcijske organele sa važnom ulogom i u intermedijernom metabolizmu, ćelijskoj signalizaciji, epigenetskoj regulaciji, kontroli ćelijskog ciklusa, diferenciranju ćelija.

Pored toga esencijalne su u regulaciji unutarćelijske homeostaze kalcijuma i u programiranoj ćelijskoj smrti – apoptozi (Duchen, 2000). U normalnoj spermatogenezi sve prekursorske ćelije gameta ne dostižu zrelost i smrt ćelija je fiziološka pojava (Sinha Hikim i sar., 2003). Apoptoza ima važnu ulogu u regulaciji spermatogeneze i normalne funkcije adultnog reproduktivnog tkiva i zapaža se u spermatogenim ćelijama pre ili posle ulaska u mejozu. Eliminacija prekursorskih ćelija pre mejotičkih deoba najverovatnije je usled visokog proliferativnog kapaciteta ovih ćelija te je apoptoza neophodna kao deo programa održanja homeostaze i kao vrsta kontrole kvaliteta. Apoptoza mejotičkih spermatogenih ćelija nastaje usled grešaka u odigravanju razmene homologih hromozoma ili nepopravivih oštećenja hromozoma odnosno molekula DNK. Saglasno tome neke forme muške neplodnosti mogu biti uzrokovane abortivnim, nedovršenim programom ćelijske smrti prekursorskih ćelija gameta. Marker apoptoze su prisutni u izlučenom semenu, i to više kod neplodnih muškaraca u odnosu na zdrave subjekte (Steger i sar., 2008).

Mitohondrije su takođe polazna tačka za biosintezu steroidnih hormona (Stocco i McPhaul, 2006; Miller, 2013), tako da je ATP sintetisan u mitohondrijama neophodan i za steroidogenezu u Lejdigovim ćelijama (Midzak i sar., 2011).

Mitohondrije igraju važnu ulogu u sazrevanju (maturaciji) i funkciji spermatozoida. One snabdevaju spermatozoide energijom i na taj način igraju važnu ulogu u spermatogenezi, diferencijaciji, pokretljivosti, akrozomalnoj reakciji, fuziji sa jajnom ćelijom i oplodjenju (Agarwal i sar., 2008). Pored toga, kroz signalni put Ca^{2+} mitohondrije regulišu hiperaktivaciju spermatozoida i flagelarnu aktivnost, tokom događaja koji vode do fertilizacije, sinteze proteina i aktivacije energetskog metabolizma (Gur i Breibart, 2006; Publicover i sar., 2008) (Slika 7).



Slika 7. Funkcije mitohondrija spermatozoida (ROS, *engl.* reactive oxygen species; RNS, *engl.* reactive nitrogen species).

Poslednjih godina nađena je veza između aktivnosti mitohondrija i funkcionog statusa spermatozoida. Značaj mitohondrija u funkcionisanju spermatozoida je potvrđen dokazima da njihov funkcioni status pozitivno korelira sa fertilizacionim potencijalom i kvalitetom humanih spermatozoida (Kasai i sar., 2002; Marchetti i sar., 2004; Gallon i sar., 2006). Štaviše, prema najnovijim saznanjima, aktivnost mitohondrija može biti kriterijum za izbor najpotentnijeg spermatozoida za IVF.

Glavne determinante funkcionosti mitohondrija spermatozoida su aktivnost i ekspresija komponenti elektron transportnog lanca (*engl.* electron transport chain, ETC) (Ruiz-Pesini i sar., 1998; Hüttemann i sar., 2003), kao i mitohondrijalni membranski potencijal (*engl.* mitochondrial membrane potential, MMP) (Marchetti i sar., 2004; Gallon i sar., 2006). Stoga nije iznenađujuće da bilo koji poremećaj komponenti mitohondrijalnog elektron transportnog lanca ili membranskog potencijala jeste povezan sa smanjenjem pokretljivosti spermatozoida, smanjenjem mogućnosti oplodjenja (fertilizacionog potencijala spermatozoida) i neplodnošću muškaraca (Marchetti i sar., 2002, 2004; Rossato, 2008). Zato se smatra da je u osnovi astenozoospermije, smanjene pokretljivosti spermatozoida i njihove vijabilnosti, smanjena funkcija mitohondrija. To vodi smanjenu stope ili mogućnosti oplodjenja i predstavlja jedan od bitnih faktora neplodnosti muškaraca.

Mitohondrije spermatozoida imaju važnu ulogu u sintezi proteina. Generalno je prihvaćeno da je genska ekspresija u zrelom spermatozoidu ograničena na mitohondrije. Spermatozoidi sisara su sposobni da sintetišu mitohondrijalno kodirane RNK

(MacLaughlin i Turner, 1973; Hecht i Williams, 1978; Alcivar i sar., 1989) i proteine (Ahmed i sar., 1984; Twaina-Bechor i Bartoov, 1994). Takođe, suprotno prethodnim tvrdnjama (Diez-Sanchez i sar., 2003), sugerisano je da sisarski spermatozoidi sintetišu proteine kodirane u genomu nukleusa, barem tokom kapacitacije (Gur i Breitbart, 2006). Ovakvi rezultati su suprotni sa dogmom da su spermatozoidi translaciono utišane ćelije imajući u vidu pretpostavke da se translacija proteina kodiranih u nukleusu dešava na mitohondrijalnim ribozomima koji mogu biti lokalizovani izvan samih mitohondrija, a bez umešanosti citoplazmatske translacione mašinerije (Ramalho-Santos i sar., 2009).

Biološka važnost mitohondrija se ogleda i u tome što je čitav niz različitih oboljenja (mitohondrijalna oboljenja, mitohondriopatije) uzrokovan disfunkcijom ovih organela. Procenjuje se da 1 od 1000 ljudi ima neku mitohondrijalnu bolest. U osnovi ovih bolesti su mutacije mitohondrijalne DNK (mtDNK) i mutacije gena u nukleusu koji kodiraju mitohondrijalne proteine. Mitohondrijalna oboljenja upravo afektuju ona tkiva i organe koji imaju visoke energetske potrebe, potrebe za ATP, kao što su mozak, mišići i jetra.

Mitohondrije su mesto visoke produkcije i delovanja reaktivnih vrsta (ROS i RNS pre ostalih). Zato je redoks regulacija važna i za fiziološka i patološka stanja koja se vezuju za mitohondrije.

1.4. Redoks regulacija – uloga ROS i RNS u reprodukciji

Reaktivne vrste su produkti metaboličkih procesa, posebno oksidativnog metabolizma. Mitohondrijalna respiracija je važan izvor reaktivnih vrsta, posebno superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$).

Razumevanje redoks regulacije danas je zasnovano na činjenici da u niskim (fiziološkim) koncentracijama ROS i RNS imaju ulogu u regulaciji vitalnih bioloških procesa, dok se toksičnost javlja kada njihova produkcija prevazilazi fiziološke nivoe. Produkciju reaktivnih vrsta u živim sistemima evolucija je usmerila ka regulatornim mehanizmima, one su veoma važni signalni molekuli. Pokazano je da spermatozoidi proizvode ROS, uključujući $O_2^{\cdot-}$, vodonik peroksid (H_2O_2) i RNS – pre svega azot oksid (NO). Brojni procesi tokom fertilizacije su pod kontrolom ROS i RNS.

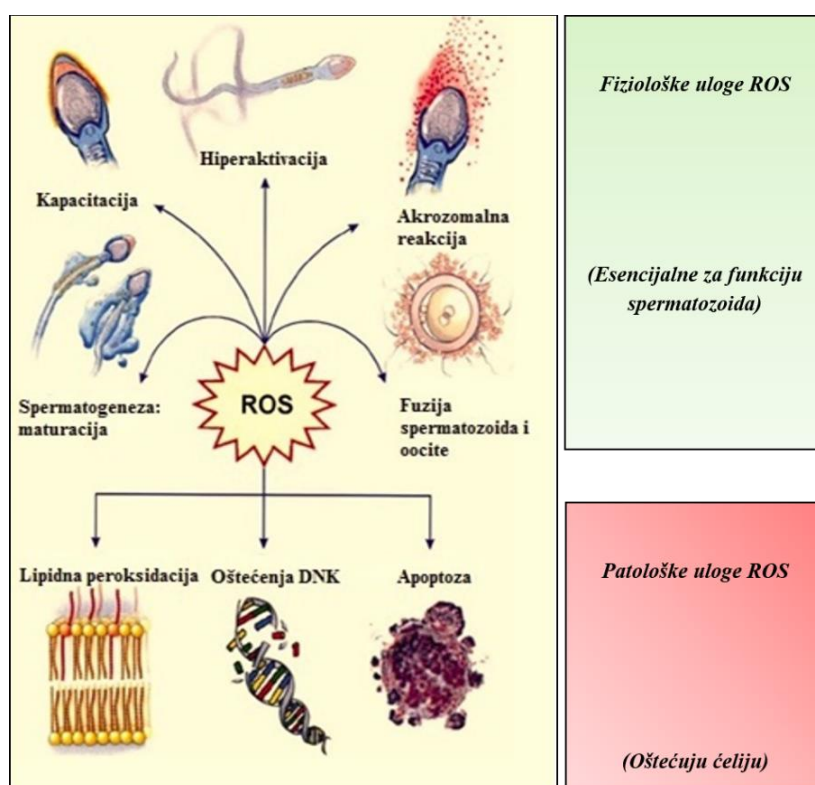
Kao što je već pomenuto, morfološki zreo i pokretan spermatozoid, nije fertilan odmah nakon ejakulacije već konačnu fertilizacionu sposobnost stiče tokom prolaska

kroz ženski reproduktivni trakt. Događaji koji prethode oplodjenju uključuju jasne metaboličke i strukturne promene spermatozoida u procesu kapacitacije. Kapacitacija na molekulskom nivou uključuje kaskadu događaja koji su inicirani produkcijom ROS i RNS u spermatozoidima: efluks holesterola, fluks bikarbonata i porast cAMP (*engl. cyclic adenosine monophosphate*), Ca^{2+} i unutarćelijskog pH (de Lamirande i sar., 1997; 2009; Herrero i sar., 1999; 2003; O'Flaherty i sar., 2006; de Lamirande i O'Flaherty, 2008). Posebno mesto u tome imaju NO i $\text{O}_2^{\cdot-}$, koji se u spermatozoidima proizvode na početku kapacitacije i kontrolišu povećanje cAMP i zavisnih protein kinaza, fosforilaciju proteina fibroznog omotača, kao i nitracije tirozinskih rezidua u proteinima.

Početak kapacitacije poklapa se sa hiperaktivacijom, kao jednom od podkategorija kapacitacije. Tada spermatozoidi pokazuju veću amplitudu i asimetrične pokrete repa, kao i nelinearnu pokretljivost, generišući veću silu da dopru do jajne ćelije. Na taj način, u ženskom reproduktivnom traktu, hiperaktivirani spermatozoidi imaju manji zastoje u epitelu jajovoda i okolnoj viskoznoj sluzi, kao i propulzivnu (pogonsku) silu da prođu kroz ćelije koje okružuju jajnu ćeliju (Miraglia i sar., 2007; Kothari i sar., 2010). Kada spermatozoid dopre do jajne ćelije, vezuje se za zonu pelucidu. Tada počinje probijanje spermatozoida i stvaranje pore u specijalizovanom vanćelijskom matriksu jajne ćelije, *zona pelucida*. Ovaj proces naziva se akrozomalna reakcija i odvija se pomoću egzocitotskog oslobađanja proteolitičkih enzima iz akrozomalne kape, koji na kraju omogućavaju spermatozoidu adekvatno vezivanje, penetraciju i fuziju sa jajnom ćelijom. Akrozomalna reakcija ima značajno preklapanje sa molekulskim događajima kapacitacije, kao što su fosforilacija tirozinskih rezidua u proteinima, influks Ca^{2+} , aktivacija adenil ciklaze (*engl. adenylyl cyclase, AC*) koja posredstvom cAMP indukuje protein kinaze A (*engl. protein kinase A, PKA*) (de Lamirande i O'Flaherty, 2008). Slično stimulaciji kapacitacije, reaktivne vrste uključujući NO, stimulišu akrozomalnu reakciju aktivirajući AC put koji inicira egzocitozu (Zini i sar., 1995).

Tokom istraživanja steriliteta pokazano je da je povećana produkcija ROS i RNS uključena u etiologiju, pre svega, steriliteta muškaraca (MacLeod, 1943; Aitkin i Clarkson, 1987; Iwasaki i Gagnon, 1992; Sukcharoen i sar., 1996; Agarwal i Allamaneni, 2004). Očigledno da ROS i RNS, bilo da su proizvedeni endogeno ili

egzogeno, na više nivoa afektuju spermatozoide i tako utiču na neplodnost kod muškaraca: smanjenom vijabilnošću i pokretljivošću, lošom morfologijom i smanjenom interakcijom sa oocitom. Mehanizam delovanja ROS i RNS uključuje lipidnu peroksidaciju ćelijske membrane koja je veoma osetljiva na oksidativna oštećenja budući da sadrži veliku količinu polinezasićenih masnih kiselina, i tako menjaju fluidnost i mobilnost membrane (Alvarez i Storey, 1995; Baker i sar., 1996). Osim toga, ROS i RNS narušavaju aksonemu spermatozoida, smanjuju funkciju mitohondrija, modifikuju DNK, RNK i proteine (de Lamirande i Gagnon, 1993; Agarwal i Prabakaran, 2005) (Slika 8).



Slika 8. Fiziološke i patološke uloge ROS (preuzeto i prerađeno iz Free radicals; Indian J Exp Biol, 2010).

1.5. NO kao signalni molekul u fertilizaciji

Poslednjih decenija je pokazano da NO ima značajnu ulogu u regulaciji mitohondrijalne funkcije.

NO je gasotransmiter koji kao signalni molekul kontroliše fundamentalne procese u ćelijama svih tkiva i organa (Alderton i sar., 2001; Govers i Oess, 2004).

Nitroglicerina, otkriven 1847. od strane italijanskog naučnika Sobrera (Marsh i Marsh, 2000) koristi se za terapiju glavobolje, a od 1870. za tretiranje *angine pectoris*. Tek je vek kasnije otkriveno da NO aktivira solubilnu guanilat ciklazu (*engl.* soluble guanylyl cyclase, sCG), tako što povećava stvaranje 3',5'-cikličnog guanozin monofosfata (*engl.* 3'5'-cyclic guanosine monophosphate, cGMP).

NO se sintetiše u gotovo svim ćelijama iz aminokiseline L-arginin u reakciji koju katalizuje enzim azot oksid sintaza (*engl.* NO synthase, NOS) (Moncada i sar., 1989). Postoje tri različite izoforme NOS: neuronalna (nNOS), koja se izvorno vezuje za nervno tkivo, endotelska (eNOS), za endotelske ćelije i inducibilna NOS (iNOS), koja je originalno identifikovana u makrofagima (Moncada i sar., 1991; Alderton i sar., 2001). Sve tri izoforme NOS su dimeri sa molekulskom masom monomera od 126-160 kDa. Izoforme NOS se razlikuju po nivou produkcije NO, iNOS produkuje više NO (μM -mM) i ostaje aktivna u dužem vremenskom periodu u poređenju sa nNOS i eNOS (nM- μM) (Moncada i sar., 1991; Alderton i sar., 2001; Buzadzić i sar., 2006; Otasevic i sar., 2011). U testisima postoji specifična nNOS (*engl.* testis-specific nNOS, TnNOS) lokalizovana u Lejdigovim ćelijama i ima ulogu u steroidogenezi. U mitohondrijama se takođe nalazi specifična izoforma NOS (mtNOS), za koju se sa sigurnošću ne može kazati kojoj od poznatih izoformi odgovara (Kobzik i sar., 1995; Bates i sar., 1996; Ghafourifar i Richter, 1999).

Humani spermatozoidi eksprimiraju sve tri izoforme NOS, koje su lokalizovane u glavi i/ili flagelarnom regionu (Herrero i sar., 2003; de Lamirande i Lamothe, 2009; de Lamirande i sar., 2009). Pokazano je da se pod kapacitirajućim uslovima, aktivnost NOS povećava vremenski-zavisno (de Lamirande i sar., 2009). Takođe je pokazano da prisustvo i aktivnost spermatozomalnih NOS zavisi od zrelosti muških polnih ćelija (Roessner i sar., 2010). Upravo korelacija između aktivnosti izoformi NOS, zrelosti i maturacije spermatozoida određuje fiziološku ulogu koju NO igra u ovim ćelijama. Često je veoma teško definisati funkciju regulisanu isključivo jednom specifičnom NOS izoformom.

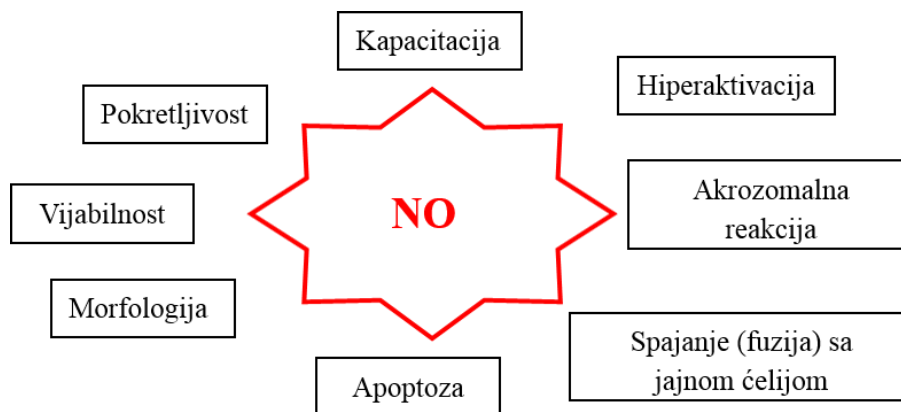
Pokazano je da NO utiče na mitohondrije tako što reguliše mitohondrijalnu respiraciju, biogenezu, remodeliranje i povećanje snabdevanja mitohondrija sa O_2 (Nisoli i sar., 2003; Petrović i sar., 2005; 2008; 2010a; 2010b; Vasilijevic i sar., 2010; Vucetic i sar., 2011). Sa druge strane NO negativno utiče na funkcije mitohondrija

spermatozoida ako se produkuje u visokim koncentracijama. Fiziološki nivoi NO povećavaju pokretljivost spermatozoida, što je povezano sa produkcijom energije u mitohondrijama (Hellstrom i sar., 1994).

NO-posredovana redoks regulacija ključnih fertilizacionih događaja spermatozoida ima važnu ulogu u razvoju neplodnosti muškaraca. Posebno je poznato da je NO uključen u regulaciju pokretljivosti spermatozoida, vijabilnost, hiperaktivaciju, kapacitaciju, akrozomalnu reakciju i spajanje sa jajnom ćelijom (Herrero i sar., 1999, 2003; de Lamirande i sar., 2009; Kothari i sar., 2010; Doshi i sar., 2012). NO ispoljava bimodalni način delovanja na pokretljivost spermatozoida. Specifično, niska koncentracija NO povećava pokretljivost spermatozoida (Weinberg i sar., 1995; Herrero i Gagnon, 2001; Miraglia i sar., 2011; Doshi i sar., 2012). Dosledno ovim otkrićima, pokazan je visok nivo NO u spermi neplodnih muškaraca sa smanjenom pokretljivošću spermatozoida (Rosselli i sar., 1995; Perera i sar., 1996; Balercia i sar., 2004).

Takođe, pokazano je da je produkcija nitrita kod astenozoospermičnih muškaraca niža nego kod normozoospermičnih, podvlačeći da opadanje endogene koncentracije NO utiče na pokretljivost spermatozoida i posledično na njihov fertilizacioni potencijal (Lewis i sar., 1996; Bolanos i sar., 2008). Osim toga, NO doprinosi i normalnoj morfologiji spermatozoida, što se pokazalo kao pouzdan način za predikciju fertilizacionog statusa i ishoda trudnoće tokom vantelesnog oplodjenja (Revelli i sar., 2001).

Slično pokretljivosti spermatozoida, pokazano je da visok nivo NO indukuje atipičnu morfologiju spermatozoida (Wu i sar., 2004) (Slika 9).



Slika 9. Delovanje NO na ključne procese u spermatozoidima.

Od početka primene IVF ustanovljeno je da, kao rezultat normalnog metabolizma gameta nastaju ROS i RNS i da one *in vitro*, u medijumu, ostvaruju nepovoljne efekte na spermatozoide i oocite, njihovu interakciju i uspeh asistiranog postupka.

Dugi niz godina reaktivne vrste smatrane su štetnim i imperativ je bio da se, naročito u procesu IVF, kada su spermatozoidi izloženi većem oksidativnom pritisku nego *in vivo*, uklone suplementacijom antioksidantima. Neke od strategija su uključivale suplementaciju medijuma za kulturu antioksidantima (vitamin E), kao i uklanjanje ćelija koje proizvode ROS (uglavnom leukocita i oštećenih spermatozoida) gradijentom gustine pri preparaciji spermatozoida, kao i inkubaciju pod smanjenim pritiskom kiseonika i osvetljenja. Ipak, nasuprot uključenosti ROS i RNS u razvoju neplodnosti kod muškaraca, unos suplemenata doveo je do poboljšanja reproduktivne funkcije samo u odabranim slučajevima (Dawson i sar., 1992; Kessopoulou i sar., 1995). Druge studije su pokazale da nije došlo do promena parametara sperme i plodnosti čak i posle produžene suplementacije antioksidantima (Hughes i sar. 1998; Rolf i sar., 1999). Ovi podaci su otvorili pitanje opravdanosti primene antioksidanata kao dopunske terapije neplodnosti kod muškaraca.

Ključ „neuspeha” antioksidativne terapije u tretmanu muške neplodnosti je u tome što su ROS i RNS u kontrolisanim, fiziološkim koncentracijama neophodni za funkcionisanje spermatozoida. Zato je neophodno da se ROS i RNS održava na odgovarajućem nivou. Pokazano je da tokom normalnog metabolizma spermatozoidi i oocite produkuju ROS i RNS, koje u fiziološkim koncentracijama funkcionišu kao sekundarni glasnici regulišući ključne reproduktivne procese. Naime, pokazano je da u humanim spermatozoidima čak poboljšavaju njihov funkcioni status (de Lamirande i sar., 1997; Leclerc i sar., 1997). Ta saznanja dozvoljavaju danas da se može tvrditi da su esencijalni procesi tokom fertilizacije redoks-senzitivni, odnosno da uključuju regulatorne mehanizme u kojima reaktivne vrste imaju ključnu ulogu.

Do danas, većina sprovedenih ispitivanja su bila usmerena na NO-zavisno poboljšanje funkcije spermatozoida tretmanom prekursorom NO sinteze, L-argininom (Scibona i sar., 1994; Aydin i sar., 1995; Patel i sar., 1998; Stanislavov i sar., 2009). Pored toga i drugi metabolički produkti L-arginina igraju značajnu ulogu u regulaciji osnovnih ćelijskih procesa i fizioloških funkcija (Vasiljević i sar., 2007; Stančić i sar.,

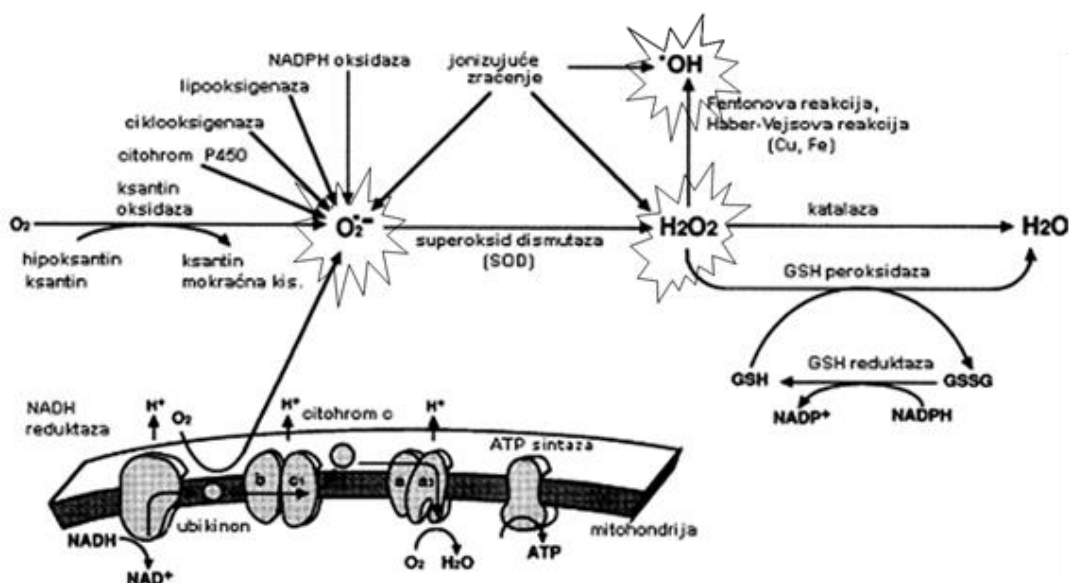
2012). Pokazano je da L-arginin ostvaruje povoljan efekat i kod poremećenih, izmenjenih parametara muške plodnosti (poboljšanje u broju i pokretljivosti kod oligozoospermičnih i asthenozoospermičnih pacijenata), posredstvom indukcije biosinteze NO (Scibona i sar., 1994; Aydin i sar., 1995; Srivastava i sar., 2000).

L-arginin i njegovi metaboliti imaju ulogu u regulaciji energetskog metabolizma svake ćelije, stoga je neophodna adekvatna kontrola primene. Kada se koristi u odgovarajućim, fiziološkim dozama, L-arginin pokazuje višestruke pozitivne efekte. Suprotno, suplementacija visokim, suprafiziološkim dozama (Luiking i sar., 1998; Grimble, 2007) i tokom dužeg vremenskog perioda (Park, 1993; Tome i sar., 1999) može izazvati nuspojave (mučninu, gastrointestinalnu nelagodnost, diareju kao i promene elektrolita u krvi, uključujući kalijum). Osim toga postoji ograničenje u upotrebi L-arginina kod nekih patoloških stanja i bolesti, kao što su infarkt miokarda (Schulman i sar., 2006), astma (Takano i sar., 1998), virusne infekcije (Tankersley, 1964), kancer (Yeatman i sar., 1991; Grossie, 1996), kao i bolesti bubrega i jetre (Tome i sar., 1999; Appleton, 2002). L-arginin deluje i na erektilnu funkciju, te je stoga ograničena primena kod pacijenata sa povišenim krvnim pritiskom.

1.6. Enzimi antioksidativne odbrane spermatozoida

Već smo istakli da ROS/RNS u fiziološkim koncentracijama učestvuju u regulaciji brojnih fizioloških procesa kao što su: unutarćelijska i međućelijska signalizacija, genska ekspresija, uklanjanje oštećenih i ostarelih ćelija i kontrola tonusa krvnih sudova. Međutim, u višim koncentracijama, iznad fizioloških vrednosti, ROS izazivaju ozbiljna oštećenja ćelija (lipidnu peroksidaciju, oštećenje membranskih proteina), unutarćelijskih proteina, molekula DNK kao i modifikaciju ugljenih hidrata. Upravo zbog toga, organizam ima razvijene brojne mehanizme za uklanjanje i/ili sprečavanje proizvodnje ROS. Neki od njih su enzimski, čine prvu liniju antioksidativne odbrane, a drugi neenzimski kao vitamini E i C, koenzim Q ili redukovani glutation (*engl.* glutathione, GSH). Osim antioksidativne odbrane koja funkcioniše unutar ćelija razvijeni su i mehanizmi zaštite izvan ćelija. Nju obavljaju: albumin, transferin, vanćelijska izoforma superoksid dismutaza (*engl.* superoxide dismutase, SOD), vanćelijska glutation peroksidaza (*engl.* glutathione peroxidase, GSH-Px), glukoza, bilirubin, urati i mnogi drugi molekuli. Metabolički procesi odvijaju se unutar tačno

određenih delova ćelije što je uslovalo i specifičnu subćelijsku organizaciju antioksidativne odbrane. Pregled najbitnijih komponenti antioksidativne odbrane, reaktivnih vrsta i puteva njihove interkonverzije prikazan je na Slici 10.



Slika 10. Šematski prikaz izvora ROS i osnovnih principa antioksidativne odbrane u ćelijama.

SOD katalizuju dismutaciju $O_2^{\bullet -}$ do H_2O_2 i O_2 . Zavisno od metala u aktivnom centru kod eukariota postoje mangan SOD (*engl.* manganese superoxide dismutase, MnSOD) i bakar, cink SOD (*engl.* copper zinc superoxide dismutase, CuZnSOD). MnSOD je primarno lokalizovana u mitohondrijalnom matriksu i nukleusu, dok je CuZnSOD pretežno citoplazmatska izoforma, ali se u manjoj meri nalazi i u međumembranskom prostoru mitohondrija, nukleusima i u vanćelijskom prostoru kao glikoprotein visoke molekulske mase. Produkt reakcije dimutacije, H_2O_2 , u prisustvu jona gvožđa može biti konvertovan do hidroksil radikala ($HO\cdot$), koji indukuje oksidativna oštećenja ćelija. Uklanjanje H_2O_2 omogućeno je katalazom koja razgrađuje H_2O_2 do vode i O_2 i nalazi se uglavnom u peroksisomima. GSH-Px takođe uklanja H_2O_2 , pri čemu koristi GSH kao kofaktor. Obnova redukovanog GSH iz oksidovane forme, katalizovana je glutatjon reduktazom. GSH je ključni ćelijski redoks pufer i ima brojne uloge, od redukcije organskih i neorganskih peroksida, detoksifikacije različitih metabolita spontanom konjugovanjem ili u reakcijama katalizovanim glutatjon S-transferazom, održanja nivoa vitamina C, do uklanjanja $HO\cdot$ i $O_2^{\bullet -}$.

Postoji više izoformi GSH-Px i sve su selenoproteini. Izoforma GSH-Px4 je prisutna u citoplazmi, mitohondrijama i nukleusu i ima važnu ulogu u sprečavanju lipidne peroksidacije. Za razliku od ostalih izoformi, GSH-Px4, poznata i kao fosfolipid hidroksiperoksid glutation peroksidaza (PHGSH-Px), može da redukuje ne samo H₂O₂ već i hidroperokside masnih kiselina. GSH-Px4 ima važnu ulogu u spermatozoidima. Esencijalna je za formiranje i organizaciju mitohondrijalnog heliksa i čini približno 50% sadržaja proteina središnjeg regiona ćelije. Miševi kojima nedostaje mitohondrijalna GSH-Px4 su neplodni sa abnormalnim i manje pokretnim spermatozoidima. Značaj GSH-Px4 da obezbedi normalnu funkciju sperme je pokazana i kod ljudi. Spermatozoidi muškaraca koji imaju probleme sa plodnošću su slabo pokretljivi i sa izmenjenom morfologijom (Imai i sar., 2001).

Važno je istaći da GSH-Px4 u spermatozoidima ima ulogu u formiranju mitohondrijalnog omotača (interaguje sa hidroperoksidima) tokom spermiogeneze, a da je njena antioksidativna aktivnost, manja od 3% od ukupnog sadržaja proteina u ejakuliranim spermatozoidima, od manjeg značaja za funkciju spermatozoida i može biti jedino dobijena posle *in vitro* solubilizacije sa visokim koncentracijama ditionitrola (0.1M) u prisustvu guanidina (Ursini i sar., 1999). Selen je od suštinskog značaja za spermiogenezu što je potvrđeno i prisustvom spermatozoida izmenjene morfologije i slabom pokretljivošću u selen-deficijentnim miševima i kod domaćih životinja koje žive u oblastima sa niskim nivoima selena (Flohé, 2007; Kaushal i Bansal., 2009).

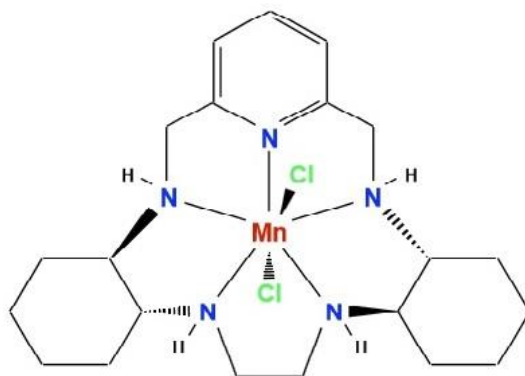
1.7. Primena SOD mimetika u medicini

Ravnoteža između fizioloških i patoloških efekata ROS i RNS je važan aspekt održanja života, zato je biološka redoks regulacija – održanje ravnoteže, važna za razumevanje procesa u ćelijama i primenu u kliničkoj medicini.

Brojna patofiziološka stanja kao što su kardiovaskularna oboljenja, inflamacija, oštećenja centralnog nervnog sistema, kancer, starenje, karakteriše povećana produkcija O₂^{•-} (Muscoli i sar., 2003). Iako je nativna SOD dugo istraživana u prekliničkim i kliničkim studijama, postojali su nedostaci i puno otvorenih pitanja vezanih za njenu primenu kao terapijskog agensa. Njeno korišćenje je pre svega limitirano veličinom molekula, kratkim poluživotom u cirkulaciji i indukcijom imunskog odgovora. Stoga se pojavila potreba za novim aktivnim molekulima sa superoksid dismutaznom aktivnošću,

mimeticima SOD. Mimetici su se pokazali kao netoksični mali peptidni molekuli, stabilni *in vivo*, ne-imunogeni koji lakše dospevaju do ciljnog mesta i ulaze u ćelije. Metal koji sadrže (Mn, Cu, Fe) karakteriše pojedine klase i važan je za katalitičku aktivnost (Iranzo, 2011).

Hepta-koordinovani Mn (II) pentaazamakrociklični SOD mimetik, M40403 (Slika 11) je reprezentativni predstavnik Mn klase mimetika. M40403 je potentan sintetski enzim, male molekulske mase (450 Da) koji je pokazao zadovoljavajuće efekte kod akutnih i hroničnih zapaljenja, srčanog udara, arteroskleroze i hipertenzije. Takođe su zapaženi pozitivni efekti i kod kardiomiopatija, dijabetesa, kancera, neuroloških poremećaja, transplantacije organa i cistične fibroze. Nalazi se u III fazi kliničkih ispitivanja u Sjedinjenim Američkim Državama (Vallance i Leiper, 2002; Salvemini i sar., 2002).



Slika 11. Struktura SOD mimetika 40403.

Glavna prednost SOD mimetika M40403 je visoka katalitička selektivnost prema $O_2^{\cdot-}$ (Muscoli i sar., 2003; Riley i Schall, 2007). Niska reaktivnost ove klase SOD mimetika prema NO u biološkim modelima *ex vivo* je takođe nedavno pokazana (Filipović i sar., 2008; 2010). M40403 selektivno uklanja $O_2^{\cdot-}$ sa odsustvom peroksidazne i katalazne aktivnosti. Takođe, pokazano je da ne reaguje sa NO i peroksinitritom, što ga izdvaja od drugih mimetika i pruža mogućnost za selektivno moduliranje redoks ravnoteže (Cuzzocrea i sar., 2001; Salvemini i sar., 2001; Salvemini i sar., 2006).

M40403 ostvaruje svoje biološke efekte ne samo usled uklanjanja $O_2^{\bullet-}$ i smanjivanja njegove koncentracije u ćelijama već i indirektno, smanjenjem interakcije $O_2^{\bullet-}$ sa NO i time održanja koncentracije NO. Iz tih razloga SOD mimetici, time i M40403, se danas razmatraju kao potentni redoks modulatori u brojnim patofiziološkim stanjima pa i u reproduktivnoj medicini.

1.8. Sastav i značaj semene plazme za funkcionalnost spermatozoida

Po funkciji i specifičnosti građe i organizacije zreli spermatozoidi se razlikuju u odnosu na druge ćelije u telu. Razlike se odnose na redukciju volumena ćelije tokom spermatogeneze (čak 40 puta, sa $1500\mu m^3$ na $40\mu m^3$), promenu oblika ćelije praćenu formiranjem repa i sticanjem pokretljivosti, gusto spakovanu DNK protaminima, odsustvo endoplazminog retikuluma, minimalnu količinu citoplazme, kao i broj i organizaciju mitohondrija. Zato je mikroskopski pregled semena i dalje zlatni standard u proceni (ne)plodnosti muškaraca. Postoje muškarci sa normalnim parametrima semena, ali sa neostvarenom plodnošću, kao i muškarci koji su ostvarili ili ostvaruju oplodjenje a imaju slabe karakteristike semena.

Pri izlučivanju (ejakulaciji), spermatozoidi se mešaju sa sekretima iz prostate i semenih kesica i postoji neposredno formiranje koagulumu napravljenog uglavnom od semenogelina, proteina koji predstavlja oko 10-20% proteina semene plazme. U sastav plazme ulaze još i fruktoza, vitamin C, kompleks vitamina B, gvožđe, bakar i druge mineralne materije kao i organske materije (spermin, spermidin) i enzimi. Bez ove tečne sredine u kojoj su resuspendovane muške polne ćelije ne bismo mogli da odredimo njihove osnovne parametre (broj, pokretljivost i morfologiju) koje najčešće koristimo za procenu i predviđanje plodnosti jednog muškog uzorka.

Semena plazma sadrži više antioksidativnih komponenti nego bilo koji drugi fiziološki fluid. Među proteinima neophodnim za opstanak i funkciju spermatozoida, semena plazma je snabdevena brojnim antioksidativnim enzimima kao što su SOD, katalaza i GSH-Px kao i različitim ne-enzimskim antioksidantima kao što su askorbat, urat, α -tokoferol, piruvat i u manjoj količini GSH. Ova zaštita je usmerena ka obezbeđivanju kvaliteta muške polne ćelije i plodnosti.

Nedavno je pokazano da proteini semene plazme mogu služiti i kao važni biomarkeri muške plodnosti (Sharma i sar., 2013). Osim toga, funkciona proteomska

analiza otkriva proteine koji su prekomerno ili nedovoljno eksprimirani u semenoj plazmi muškaraca sa lošim kvalitetom semena.

Ako se prihvata činjenica da se likvefakcija (razvodnjavanje) koaguluma odigrava u 30 minuta, i to uglavnom usled delovanja prostata specifičnog antigena (*engl.* prostate-specific antigene, PSA) i serin proteaza, postoji mogućnost da je ovaj proces takođe redoks regulisan. Chatterjee i sar. (1997) su pokazali da $O_2^{\cdot-}$ promoviše, a SOD blokira likvefakciju. Imajući u vidu da je koncentracija kiseonika u epididimisu i akcesornim žlezdama 5% i da naglo raste u semenu pri ejakulaciji na oko 20%, (usled atmosferskog pritiska), ova promena može uticati na nivo ROS i redoks okruženje.

Za plodnost je veoma bitan i broj spermatozoida. Izražen po mililitru, broj spermatozoida visoko je značajan, i donje granične vrednosti parametara od ≥ 15 miliona po mililitru zapremine semena koje propisuje Svetska zdravstvena organizacija (2010) karakterišu normalan broj, normozoospermiju. Ukoliko je broj ispod te najniže referentne vrednosti reč je o oligozoospermiji. Mnogo značajniji parametar je ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, budući da zapremina semena mora biti adekvatna i održava se na vrednosti od 1.5 ml. Kada je smanjena zapremina ejakulata (hipospermija) izmenjen je i broj spermatozoida. Prema tome, ne mogu se na isti način tretirati pacijenti sa oligozoospermijom i malom količinom sperme i oni koji u velikom volumenu sperme imaju manji broj spermatozoida. U svim slučajevima oligozoospermije, dijagnoza se može sa sigurnošću postaviti tek posle pregleda nekoliko uzoraka semena, jer i kod pacijenta koji su dokazano fertilni postoje izražene varijacije u broju spermatozoida.

Smanjen procenat pokretnih spermatozoida nazivamo astenozoospermijom. Astenozoospermija je najčešće udružena sa oligozoospermijom, mada se kod jednog broja pacijenata može naći i uz normalan broj spermatozoida. Uzrok smanjene pokretljivosti i vijabilnosti spermatozoida može biti u lošoj funkciji mitohondrija što vodi smanjenju stope ili mogućnosti oplodjenja i predstavlja jedan od bitnih faktora neplodnosti muškaraca.

Posebnu kategoriju čine pacijenti sa nekrozoospermijom kod kojih nijedan spermatozoid nije pokretan. U ovim slučajevima je verovatnije u pitanju poremećaj u građi samih spermatozoida, na šta ukazuju elektron-mikroskopske studije.

U savremenoj dijagnostici i lečenju neplodnosti muškaraca posebna pažnja se pridaje samom obliku, odnosno morfologiji spermatozoida. Nedostatak akrozoma, koji se može uočiti prilikom mikroskopskog pregleda uzorka, onemogućava fertilizaciju i pacijenti su neplodni, uprkos prisustvu zadovoljavajućeg broja spermatozoida u ejakulatu.

Pacijenti sa promenjenim oblikom i strukturom spermatozoida, sa donjom granicom prisustva normalnih formi od četiri procenta, dijagnostikuju se kao teratozoospermija.

Novija istraživanja u prvi plan stavljaju ROS i RNS, bilo da je u pitanju njihova fiziološka uloga, ili da su uključeni u neka od patoloških stanja karakterističnih za spermatozoide.

Imajući u vidu sva ova saznanja i činjenicu da neplodnost trenutno pogađa jedan od sedam parova u svetu, pojavila se potreba za razvojem novih strategija za tretman steriliteta. Kako je pokazano da su ključni procesi u spermatozoidima redoks osetljivi, neophodno je detaljno proučiti molekulske mehanizme uključene u (pato)fiziološke promene ovih ćelija.

2. Cilj

Uključenost ROS i RNS ($O_2^{\bullet-}$ i NO pre svega) u etiologiji muškog steriliteta sugerirše da je održanje njihove koncentracije neophodno i za regulaciju fizioloških procesa i aktivaciju patoloških stanja vezanih za spermatozoide. Uz to, mitohondrije su ne samo mesto visoke produkcije reaktivnih vrsta u ćeliji, već organele od čijeg funkcionog statusa zavisi, odnosno sa njim pozitivno korelira, fertilizacioni potencijal i kvalitet humanih spermatozoida. Međutim, molekulska osnova delovanja ROS/RNS na funkcionost spermatozoida, posebno njihovog uticaja na funkcioni status mitohondrija još uvek je nepoznata.

Cilj doktorske disertacije je ispitivanje efekata modulacije redoks statusa spermatozoida na ključne parametre koji determinišu funkcioni status, odnosno aktivnost mitohondrija, kao i funkcionih parametara koji determinišu kvalitet spermatozoida podjednako na molekulskom i strukturnom nivou. Poseban akcenat disertacije biće na praćenju uključenosti reaktivnih vrsta, odnosno redoks-zavisnih mehanizama, na funkcionost mitohondrija i time samih spermatozoida.

Iz tih razloga, redoks status spermatozoida će se specifično modulirati pentazaamakrocikličnim Mn(II) mimetikom SOD, M40403, koji selektivno uklanja $O_2^{\bullet-}$ i indirektno modulira bioraspoloživosti NO.

U cilju ispitivanja signalnih puteva i uloge NO u regulaciji fertilizacionih procesa, naročito eventualnog uticaja NO na poboljšanje funkcionog statusa mitohondrija i fertilizacionih svojstava spermatozoida, ispitiće se:

- Promene koncentracije NO, elektrohemijski, korišćenjem NO specifične elektrode, kao i korišćenjem fluorescentne probe specifične za NO (diaminofluorescein-2-acetat);
- Lokalizacija produkcije NO u spermatozoidima;
- Efekat na endogenu produkciju NO praćenjem ekspresije izoformi NOS: endotelske, neuronalne i iducibilne;
- Efekat na enzime ključne za uklanjanje (CuZnSOD i MnSOD) i produkciju $O_2^{\bullet-}$ (NADPH oksidaza);

- Ekspresija enzima katalaze i GSH-Px, odgovornih za uklanjanje H_2O_2 koji nastaje aktivnošću SOD i SOD mimetika;
- Mitohondrijalna dinamika i metabolički status, praćenjem mitohondrijalnog membranskog potencijala (katjonska fluorescentna proba Mitotracker Green FM) i ekspresije komponenti respiratornog lanca.

Pored toga ispitivaće se osnovni parametri semene plazme i spermatozoida, kao i korelacija sa nivoom enzima antioksidativne odbrane u semenoj plazmi.

Ostvarivanje zadatah ciljeva treba da unapredi poznavanje redoks-procesa u reproduktivnoj biologiji i produbi saznanja o molekulskim mehanizmima delovanja ROS i RNS, posebno na funkciju mitohondrija i fertilizacioni kapacitet spermatozoida.

3. Materijal i metodi

3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka

U ovoj studiji korišćeni su spermatozoidi normozoospermičnih pacijenata. Klasifikacija uzoraka spermatozoida je urađena po kriterijumima koje je utvrdila Svetska Zdravstvena Organizacija, SZO (Tabela 1).

Tabela 1. Kriterijumi za analizu muškog uzorka po SZO.

<i>Parametar</i>	<i>Donja granična vrednost</i>
Prosečna starost donora (god)	NA
Vreme apstinencije (dan)	2
Zapremina ejakulata (ml)	1.5
Broj spermatozoida (*10 ⁶ /ml)	> 15
Pokretljivost (%)	> 40
Normalna morfologija (%)	> 4
Broj leukocita	< 6
Broj eritrocita	(-)

Etički komitet Klinike za ginekologiju i akušerstvo „Narodni front“ je odobrio ovo istraživanje. U studiji ne postoji konflikt interesa niti je studija uključena u promociju bilo kog leka, medijuma i drugih komercijalno dostupnih materijala koji se koriste u datim postupcima.

Spermatozoidi su prikupljeni nakon dobijanja pisane saglasnosti o pristanku pacijenata, koji su regrutovani iz parova koji konkurišu za postupak vantelesne oplodnje u Odeljenju za Artificijelne reproduktivne tehnologije Klinike za ginekologiju i akušerstvo „Narodni front“ u Beogradu i kod kojih je sterilitet uzrokovan ženskim faktorom. Svi uzorci su bili dobijeni posle 3-5 dana apstinencije.

Po dobijanju muškog uzorka pristupano je standardnoj obradi koja podrazumeva likvefakciju (sobna temperatura, 20 minuta), određivanje viskoznosti i funkcionalnih parametara spermatozoida (broj, pokretljivost i morfologija).

Nakon obrade, da bi uklonili nespermatične ćelije, leukocite i nepokretne spermatozoide, uzorci su prečišćeni centrifugiranjem (20 min. na 300g) u Cookovom gradijentu gustine (40% i 80%) (Cook® Medical Inc., Irska), koji je prethodno zagrejan na 37 °C preko noći. Posle centrifugiranja, pažljivo je odstranjen sloj semene plazme i zamrznut na -20 °C. Ovi uzorci semene plazme korišćeni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane. Gornji međusloj, sloj gradijenta 40% i donji sloj koji su sadržali mrtve ćelije i druge somatske kontaminacije su odbačeni, a uzimana je spermatozoidima bogata donja frakcija (sloj sa 80% gradijentom). Dobijeni talog spermatozoida je prvo ispran u 5 ml modifikovanog Tirodovog medijuma (117.5 mM NaCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 8.6 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2 mM glukoza, 0.25 mM Na piruvat, i 19 mM Na lactat), bez goveđeg serum albumina centrifugiranjem tokom 10 minuta na 600g. Supernatant je odbačen, a talog spermatozoida podeljen u 3 eksperimentalne grupe, koje su se sastojale od po deset pacijenata.

Prva grupa uzoraka je resuspendovana u Tirodovom medijumu i ispitivana odmah (kontrola), druga (resuspendovana u Tirodovom medijumu) i treća (resuspendovana u Tirodovom medijumu koji sadrži 50 µM pentaazamakrociklični SOD mimetik, 40403) su ispitivane nakon inkubacije od tri časa na 37 °C u atmosferi sa 6 % CO₂ (CO₂ inkubator, Galaxy S, RSBiotech, UK). Vreme inkubacije je identično vremenu inkubacije i obrade spermatozoida za IVF. U svakoj grupi su spermatozoidi resuspendovani do finalne koncentracije od 40 x 10⁶ spermatozoida/ml u potrebnim zapreminama modifikovanog Tirodovog medijuma.

Pre ispitivanja spermatozoida, čistoća uzorka je ispitivana i potvrđena upotrebom svetlosnog mikroskopa (Biooptica, BPL 1000, Italy) i odsustvom amplifikacije iRNK za germinativne ćelije, epitelske ćelije i leukocite.

Po inkubaciji, spermatozoidi su centrifugirani 10 minuta na 2000g. Talog svih 30 pacijenata (n = 10 po grupi) je korišćen za merenje sadržaja NO (elektrohemijski) i sadržaja iRNK. Za bojenje Daf2-DA (*engl.* 4,5-Diaminofluorescein diacetat) i MT-G (*engl.* MitoTracker Green FM) bojenje, korišćeno je po 5 alikvota spermatozoida po grupi. Zavisno od eksperimenta, alikvoti taloga spermatozoida su različito razblaženi, što je naznačeno u dalje u tekstu, u odgovarajućem odeljku.

3.2. Određivanje pokretljivosti spermatozoida

Pokretljivost spermatozoida je određivana procenom najmanje 400 spermatozoida u svakom uzorku semena. Svaki spermatozoid je kategorizovan kao pripadnik jedne od tri kategorije spermatozoida: a) progresivan, b) neprogresivan i c) nepokretan, koristeći tehnike za ocenu i kontrolu kvaliteta prema preporuci Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO laboratory manual for the Examination and procesing of human semen; fifth edition, 2010). Za poređenja u studiji, korišćen je procenat pokretnih spermatozoida (zbir dve kategorije pokretnih spermatozoida (a+b)).

3.3. Merenje koncentracije NO u spermatozoidima

3.3.1. Elektrohemijsko određivanje količine NO

Produkcija NO u suspenziji spermatozoida od $40 \times 10^6/\text{ml}$, merena je u realnom vremenu, elektrohemijski, inNO-II azot oksid mernim sistemom, koristeći amino-700 elektrodu (Innovative Instruments, Tampa, FL, USA).

Senzor je kalibrisan konverzijom nitrita u NO u kiselom rastvoru kalijum jodida, po preporuci proizvođača (Innovative Instruments, Tampa, FL, USA). Senzor je polarizovan u vodenom rastvoru najmanje 12 časova pre kalibracije, odnosno potapanja u suspenziju spermatozoida.

3.3.2. Određivanje količine NO kvantifikacijom Daf2-DA pozitivnih spermatozoida

Daf2-DA je specifična fluorescentna proba koja se u ćeliji hidrolizuje u monoacetatni oblik (DAF-A), koji se u prisustvu NO pretvara u fluorescirajući triazolni derivat DAF-2T i na taj način ciljano obeležava NO u ćelijama.

Za detekciju i lokalizaciju NO u uzorcima, spermatozoidi su tokom 30 minuta inkubirani u atmosferi od 6% CO₂ na 37 °C u Tirodovom medijumu koji je sadržao Daf2-DA u finalnoj koncentraciji od 10 μM (de Lamirande i sar., 2008). Nakon inkubacije spermatozoidi su centrifugirani na 3000g, 5 minuta. Zatim su isprani u 100 μl Tirodovog medijuma i centrifugirani na 600g, 5 minuta. Nakon toga je odliven supernatant, a od taloga spermatozoida napravljeni su razmazi, koji su odlagani da se suše u odsustvu svetlosti. Razmazi spermatozoida su potom montirani u Mowiol® 4-88 (Polysciences Europe GmbH, eppelheim, Nemačka) i analizirani konfokalnim laserskim Carl Zeiss LSM510 mikroskopom, koristeći 63x imerzioni objektiv.

Analiza podataka je vršena korišćenjem LAS AF softvera. 200-300 spermatozoida je analizirano za svaki uzorak ponaosob u ovom eksperimentu.

3.4. Bojenje mitohondrija spermatozoida MT-G

Funkcionost mitohondrija je praćena korišćenjem MitoTracker[®] Green FM (Molecular Probes, Inc., Eugene, USA), katjonske fluorescentne probe, koja se specifično akumulira u mitohondrijama u zavisnosti od transmembranskog elektrohemijskog gradijenta i time omogućava vizuelno razdvajanje populacije spermatozoida sa aktivnim i neaktivnim mitohondrijama (Sousa i sar., 2011).

Za ovo ispitivanje talog spermatozoida je resuspendovan na 20×10^6 spermatozoida/ml u Tirodovom medijumu koji sadrži 20 nM MT-G i inkubiran na 37 °C 10 minuta, u atmosferi od 6% CO₂.

Po inkubaciji, uzorak je centrifugiran 5 minuta na 3000g, zatim je talog spermatozoida resuspendovan u 100 µl Tirodovog medijuma i ispran centrifugiranjem na 600g, 5 minuta. Supernatant je odliven i od taloga spermatozoida su napravljeni razmazi, koji su odlagani da se suše u odsustvu svetlosti. Po sušenju, razmazi su montirani u Mowiol[®] 4-88 i analizirani konfokalnim laserskim Carl Zeiss LSM510 mikroskopom, koristeći 63x imerzioni objektiv.

Analiza podataka je vršena korišćenjem LAS AF softvera. Procenat obojenih spermatozoida je determinisan brojanjem 200 spermatozoida po ljustici u četiri različita vidna polja i prikazano je reprezentativno bojenje.

3.5. Lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (*engl.* real time polymerase chain reaction, RT-PCR)

Za određivanje promena na nivou iRNK korišćen je metod RT-PCR. Relativna ekspresija je određena direktnim poređenjem dobijenih *Ct* (*engl.* cycle threshold) vrednosti, koje su normalizovane prema endogenoj kontroli. *Ct* vrednost predstavlja broj ciklusa koji je potreban da fluorescentni signal pređe prag, signal koji potiče od nespecifičnog fluorescentnog signala (*engl.* background level) i predstavlja tačku u kojoj amplifikaciona kriva ulazi u eksponencijalnu fazu. *Ct* vrednost je obrnuto proporcionalna količini ciljne nukleinske kiseline u uzorku.

Pre određivanja nivoa ekspresije ciljnog gena urađeni su validacioni eksperimenti koji su pokazali približno jednako variranje promene C_t vrednosti odgovarajućeg ciljnog gena i endogene kontrole za niz serijskih razblaženja komplementarne DNK (cDNK). U našim uzorcima je za adekvatnu endogenu kontrolu korišćena gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH).

Za ovaj metod korišćeni su alikvoti spermatozoida koncentracije 20×10^6 ćelija iz kojih je prvo izolovana iRNK, pa urađena sinteza cDNK. Naime, po inkubaciji i centrifugiranju na 2000g, 10 minuta, ćelije su resuspendovane u 1 ml TRIzol reagensa (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) i izolacija RNK urađena po preporuci proizvođača. Nakon toga je urađena sinteza cDNK. U tu svrhu, korišćen je komplet za cDNK sintezu (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) i 1 μ g ukupne RNK je preveden u cDNK. U RT-PCR je korišćen iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) koji sadrži 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 0.4 mM od svakog dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), i iTaq DNK polimerazu, (50 jedinica/ml), 6 mM MgCl₂, interkalirajuću boju – SYBR Green I, 20 nM, fluorescein i stabilizatore. Sekvence korišćenih prajmera (Metabion International AG, Martinsried, Germany) i uslovi reakcije prikazani su u Tabeli 2. RT-PCR reakcija je izvedena u 20 μ l reakcione zapremine. Svaka reakciona smeša sastojala se od: 10 μ l iQTM SYBR Green Supermix 2x, po 0.25 μ l svakog od prajmera finalne koncentracije 200 nM, 0.4 μ l ROX (Invitrogen, USA) i *nuclease free* vode do 20 μ l ukupne zapremine smeše. Po 18 μ l reakcione smeše i 2 μ l cDNK dodato je u odgovarajuće mesto na optičku ploču za RT-PCR. Uz svaki set prajmera uključena je negativna kontrola (bez cDNK), da bi verifikovali odsustvo nespecifične amplifikacije (dimere prajmera ili kontaminaciju). Sve reakcije su izvedene na aparatu ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Svaki uzorak je rađen u triplikatu, a srednja vrednost je uzeta za dalja izračunavanja. U svaku analizu bila je uključena endogena kontrola. Zbog razlika u efikasnosti amplifikacije, svaki uzorak je normalizovan na nivo ekspresije svoje endogene kontrole. Kvantifikacija je urađena komparativnom C_t metodom. Količina ciljnog gena je normalizovana na nivo ekspresije svoje endogene kontrole, i data je formulom $2^{-\Delta C_t}$, gde je $\Delta C_t = (C_t, \text{ ciljnog gena} - C_t, \text{ endogene kontrole})$. Takođe, amplifikovana iRNK spermatozoida nije bila kontaminirana testikularnim ćelijama, endotelijalnim ćelijama

ili leukocitima, budući da prajmeri za c-kit (germinativne ćelije), E-cad (epitelske ćelije) i CD45 (leukociti) nisu amplifikovali ove transkripte u izolovanoj iRNK spermatozoida.

Tabela 2. Sekvence prajmera i uslovi RT-PCR reakcija.

Gen ¹	Sekvenca prajmera	Broj ciklusa
<i>ND4</i>		
F:	5' - ACA AGC TCC ATC TGC CTA CGA CAA - 3'	40
R:	5' - TTA TGA GAA TGA CTG CGC CGG TGA - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 60 °C, 30'' na 72 °C	
<i>Ndufa6</i>		
F:	5' - CAA GAT GGC GGG GAG CCG - 3'	40
R:	5' - GTA TAG TGA GTT TAT TTG TGC TC - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 51 °C, 30'' na 72 °C	
<i>COXII</i>		
F:	5' - TGC CCT TTT CCT AAC ACT CAC AA - 3'	40
R:	5' - CGC CGT AGT CGG TGT ACT CG - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>COXIV</i>		
F:	5' - AGG TGG CCC ATG TCA AGC AC - 3'	40
R:	5' - CAT GAT AAC GAG CGC GGT GA - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>Cyt b</i>		
F:	5' - TCC TCC CGT GAG GCC AAA TAT CAT - 3'	40
R:	5' - AAA GAA TCG TGT GAG GGT GGG ACT - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 60 °C, 30'' na 72 °C	
<i>ATP sintaza</i>		
F:	5' - AGC TCA GCT CTT ACT GCG G - 3'	40
R:	5' - GGT GGT AGT CCC TCA TCA AAC T - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>Katalaza</i>		
F:	5' - CTC GTG GGT TTG CAG TGA AAT - 3'	40
R:	5' - TCA GGA CGT AGG CTC CAG AAG - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>GSH-Px</i>		
F:	5' - CCA GTC GGT GTA TGC CTT CTC - 3'	40
R:	5' - GAG GGA CGC CAC ATT CTC G - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>MnSOD</i>		
F:	5' - CCT CAC ATC AAC GCG CAG AT - 3'	40
R:	5' - CGT TCA GGT TGT TCA CGT AGG - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 15'' na 56 °C, 30'' na 72 °C	

¹Skraćenice korišćene u tabeli 2: ND4 – ND4 subjedinica kompleksa I, Ndufa6 – Ndufa6 subjedinica kompleksa I, COX II – subjedinica IV kompleksa citohrom c oksidaze (kompleksa II), COX IV – subjedinica IV kompleksa citohrom c oksidaze (kompleksa IV), Cyt b – citohrom b, Cyt c – citohrom c, GSH-Px – glutation peroksidaza, CuZnSOD/MnSOD - CuZn/Mn superoksid dismutaza, NOX – NAD(P)H oksidaza, GAPDH – glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza, iNOS – inducibilna azot oksid sintaza, eNOS – edotelijalna azot oksid sintaza.

<i>CuZnSOD</i>		
F:	5' - AGG GCA TCA TCA ATT TCG AGC - 3'	40
R:	5' - GCC CAC CGT GTT TTC TGG A - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °	
<i>NOX</i>		
F:	5' - CTC AGC GGA ATC AAT CAG CTG TG - 3'	40
R:	5' - AGA GGA ACA CGA CAA TCA GCC TTA G 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95 °C, 30'' na 60 °C, 30'' na 72 °C	
<i>GAPDH</i>		
F:	5' - CCA GTG CAA AGA GCC CAA AC - 3'	40
R:	5' - GCA CGG ACA CTC ACA ATG TTC - 3'	
Uslovi reakcije:	10'' na 95 °C, 30'' na 54 °C, 30'' na 72 °C	
<i>iNOS</i>		
F:	5' - ACG TGC GTT ACT CCA CCA ACA A - 3'	40
R:	5' - CAT AGC GGA TGA GCT GAG CAT T - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95°C, 45'' na 58°C, 30'' na 72°C	
<i>eNOS</i>		
F:	5' - TTG GCG GCG GAA GAG GAA GGA GT - 3'	40
R:	5' - CAA AGG CGC AGA AGT GGG GGT ATG - 3'	
Uslovi reakcije:	15'' na 95°C, 15'' na 58°C, 30'' na 72°C	
<i>CD45</i>		
F:	5' - ACC ACA AGT TTA CTA ACG CAA GT - 3'	40
R:	5' - TTT GAG GGG GAT TCC AGG TAA T - 3'	
Uslovi reakcije:	45'' na 95 °C, 45'' na 55 °C, 60'' na 72 °C	
<i>E-cad</i>		
F:	5' - GGC GAC GAG ATT AGG CTG TTA - 3'	40
R:	5' - GCC TTT TCC GTG ATC CAT TCA - 3'	
Uslovi reakcije:	45'' na 95 °C, 45'' na 56 °C, 60'' na 72 °C	
<i>c-kit</i>		
F:	5' - GGC GAC GAG ATT AGG CTG TTA - 3'	40
R:	5' - GCC TTT TCC GTG ATC CAT TCA - 3'	
Uslovi reakcije:	45'' na 95 °C, 45'' na 56 °C, 60'' na 72 °C	

3.6. Western blot

3.6.1. Određivanje količine proteina za Western blot

Količina proteina iz uzoraka spermatozoida je određivana po metodi Bradforda (1976). Metoda se zasniva na nespecifičnom vezivanju anjonskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazne i aromatične grupe proteina, usled čega dolazi do stvaranja kompleksa protein-boja, koji u kiseloj sredini ima maksimum apsorpcije na 595 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina koja se očitava sa standardne krive, konstruisane merenjem apsorbanace rastvora albumina (rastućih, poznatih koncentracija) na 595 nm. Koncentracija proteina se izražava u mg/ml.

3.6.2. Elektroforeza proteina

Proteini su razdvajani po molekulskim masama natrijum-dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS) – poliakrilamidnom elektroforezom (SDS-PAGE) u BioRad mini-Protean III sistemu. Korišćeni gelovi za razdvajanje su bili različite

procentnosti, zavisno od molekulske mase traženog proteina, dok su gelovi za koncentrovanje uvek bili 5% (5% akrilamid/bisakrilamid; 0.1% SDS, 0.125 M Tris, pH 6,8). Polimerizacija gelova je omogućena dodavanjem 0.05% amonijum-persulfata i 0.033% N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Puffer za rezervoare se sastojao od 0.192 M glicina, 0.1% SDS i 0.025 M Tris, pH 8,3. U određenu zapreminu proteinskog rastvora dodata je ista zapremina pufera za uzorke (4% SDS, 20% glicerol, 10% β-merkaptotanol; 0.125 M Tris, pH 6,8; 0.025% brom-fenol plavo).

Uzorci su pre nalivanja denaturisani kuvanjem 5 min, na 95 °C. Za sve ispitivane proteine nanošeno je 5 µg proteina iz uzorka. Na gelove je nanošen i proteinski marker u cilju određivanja molekulskih masa (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waitharm, MA, USA). Elektroforeza je trajala 60-90 min pri konstantnom naponu od 120 V. Nakon elektroforeze, gelovi su korišćeni za Western blot.

3.6.3. Prenos proteina sa SDS-poliakrilamidnog gela na membranu i imunološka detekcija imobilizovanih proteina (Western blot)

Proteini su sa gelova preneseni na membrane (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Membrane su aktivirane u metanolu (10 sekundi), a potom su sa gelovima pakovane i smeštane u rezervoare sa transfer puferom (0.192 M glicin, 20% metanol, 0.025 M Tris, pH 8,3). Prenos proteina sa gelova na membrane se odvijao pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min. Uspešnost transfera je proveravana 5% Ponceau S bojom rastvorenom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Membrane su potom obezbojavane ispiranjem u destilovanoj vodi i inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi u serumu za blokiranje slobodnih mesta na membrani – 5% BSA (*engl.* bovine serum albumine) u Tris-boratnom puferu sa dodatkom deterdženta Tween 20 (TBS-T: 0.2 M Tris, 1.5 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,4) ili alternativno – 5% rastvorom obranog mleka u TBS-T. Nakon blokiranja membrane su inkubirane sa primarnim antitelom.

Podaci o antitelima korišćenim u ovom eksperimentu kao i njihova koncentracija, prikazani su u Tabeli 3. Po blokiranju, membrane su inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelima rastvorenim u 5% BSA, preko noći, na 4 °C. Nakon inkubacije i ispiranja viška primarnog antitela, membrane su inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelima dobijenim imunizacijom koze na IgG zeca, odnosno miša (*engl.* goat-anti rabbit HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc. i goat-anti mouse HRP, BD Bioscience Pharmingen), u razblaženju 1:2000 (antitelo: 5% BSA) 2 h,

na sobnoj temperaturi. Po inkubaciji, membrane su ispirane TBS rastvorom, 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizuelizaciju proteina, membrane su inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu – luminolu, uz dodatak H₂O₂ (3 minuta). Nakon toga, rentgen filmovi (Hyperfilm, Amersham Pharmacia Biotech) su izlagani ekscitovanom luminolu sa membrana (1-3 min). Razvijani i skenirani filmovi su korišćeni za kvantifikaciju proteinskih traka.

3.6.4. Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blot analizom

ImageQuant softverski paket je korišćen za kvantifikaciju dobijenih traka. Rezultati su izraženi putem integracije volumena i predstavljaju sumu svih vrednosti piksela pobuđenih signalom (1 piksel = 0,007744 mm²) unutar označenog objekta (trake) vizuelizovane na prethodno objašnjeni način. Ova vrednost, umanjena za fon pozadine (*engl.* background), predstavlja intenzitet zatamnjenja (*engl.* volume) na površini zaokružene trake.

Tabela 3. Primarna antitela korišćena za Western blot.

Antitelo ¹	Proizvođač, kat. br.	Razblaženje/ koncentracija (mg/ml ili v/v)	Mr (kDa)
CuZnSOD	Abcam, ab13498	0,2 µg/ml	~18
MnSOD	Abcam, ab13533	1:5000	25
Katalaza	Abcam, ab18771	1:1000	59
Kompleks I OXPHOS (Ndufa9)	Abcam, ab55521	2,5 µg/ml	43
Kompleks III OXPHOS	Abcam, ab14745	0,5 mg/ml	48
Kompleks IV OXPHOS (COX IV)	Abcam, ab14744	0,1 mg/ml	17
Citohrom <i>c</i>	Abcam, ab18738	1,0 mg/ml	15

²Skraćenice korišćene u tabeli 3: CuZnSOD – CuZn superoksid dismutaza, MnSOD – Mn superoksid dismutaza, OXPHOS – oksidativna fosforilacija, COX IV –IV subjedinica citohrom *c* oksidaze.

3.7. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane u semenoj plazmi

3.7.1. Određivanje količine proteina u semenoj plazmi

Količina proteina je određivana po metodi Lowry i saradnika (1951). Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza i Cu^{2+} jona u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa aromatičnim aminokiselinama (triptofan i tirozin) u polipeptidnim lancima. Nastalo kompleksno jedinjenje plave boje ima maksimum apsorpcije na 500 nm. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji proteina koja se očitava sa standardne krive, konstruisane merenjem apsorbance rastvora albumina (rastućih, poznatih koncentracija) na 500 nm. Koncentracija proteina se izražava u mg/ml.

3.7.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost SOD određivana je modifikovanom metodom Misre i Fridovicha (1972). U ovoj metodi se koristi adrenalin kao izvor superoksid anjon radikala. Naime, autooksidacijom adrenalina u baznoj sredini nastaje $\text{O}_2^{\cdot-}$ koji ubrzava ovu reakciju. Brzina autooksidacije adrenalina prati se spektrofotometrijski na 480 nm. SOD sprečava autooksidaciju adrenalina pri čemu stepen inhibicije reakcije predstavlja meru aktivnosti enzima. Zapremina uzorka, odnosno količina proteina, koja dovodi do 50% inhibicije brzine autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance smatra se jedinicom aktivnosti SOD. SOD aktivnost se izražava u jedinicama po mg proteina.

3.7.3. Određivanje aktivnosti katalaze

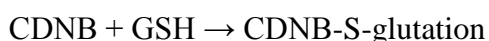
Aktivnost katalaze je određivana po metodi Beutlera (1982) koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju promene apsorbance na 230 nm. Na ovoj talasnoj dužini H_2O_2 ima maksimum apsorpcije koji se menja usled razgradnje standardne koncentracije H_2O_2 (10 mM) katalazom iz uzorka. Aktivnost katalaze izračunava se preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta za vodonik peroksid (0.071), a vrednosti se izražavaju u jedinicama po mg proteina.

3.7.4. Određivanje aktivnosti glutacion peroksidaze

Aktivnost GSH-Px je određivana po metodi Paglia i Valentina (1967). Jedinica aktivnosti GSH-Px je definisana kao količina enzima koja oksiduje 1 nM NADPH u minuti i rezultati su izraženi u jedinicama po mg proteina.

3.7.5. Određivanje aktivnosti glutacion S-transferaze

Za određivanje aktivnosti glutacion S-transferaze korišćen je metod Habiga i sar. (1974) koji se zasniva na reakciji 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) sa GSH, katalizovanoj GST:



Aktivnost enzima se određuje merenjem promene apsorpcije nastalog jedinjenja koje apsorbuje svetlost na 340 nm. GST aktivnost izračunava se preko molarnog ekstinkcionog koeficijenta CDNB (9.6) i izražava se u nM GSH min⁻¹ mg⁻¹ proteina.

3.8. Statistička obrada rezultata

Statistička značajnost dobijenih rezultata je testirana GraphPad Software 3.03. Za poređenje rezultata između grupa korišćena je ANOVA. Statistička značajnost rezultata je određivana Tukey testom. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće p<0.05.

Za ispitivanje odnosa proteinske ekspresije/aktivnosti AD enzima u semennoj plazmi sa funkcionim parametrima spermatozoida korišćen je Pirsonov koeficijent. Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost (± S.E.M.). Vrednosti verovatnoće manje od 0.05 su smatrane statistički značajnim.

4. Rezultati

4.1. Karakteristike nativnih uzoraka semena za analizu spermatozoida

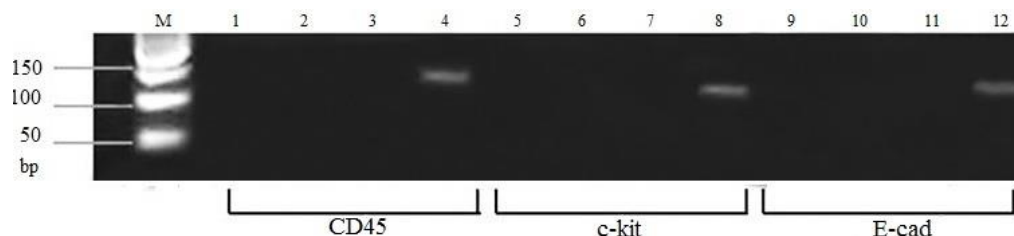
U Tabeli 4 su prikazane karakteristike nativnih uzoraka semena muškaraca, uzoraka spermatozoida, kao i semene plazme (pre obrade u gradijentu gustine), normozoospermičnih pacijenata koji su prikupljeni i korišćeni za istraživanje.

Tabela 4. Karakteristike nativnog uzorka semena.

<i>Parametri</i>	<i>Prosečna vrednost</i> (30 uzoraka)	<i>Minimum / Maksimum</i>
Starost pacijenata (godine)	35	(30, 37)
Volumen semena (ml)	3.0	(2.2, 3.4)
Ph semena	7.5	(7.2, 7.9)
Koncentracija spermatozoida ($10^6/ml$)	61.3	(30, 83)
Pokretljivost (%)	72	(68, 98)
Normalna morfologija (%)	46.1	(50, 72)
Broj leukocita	0.5	(0, 3)
Broj eritrocita	(-) odsutni	(-) odsutni

4.1.1. Rezultati ispitivanja čistoće uzoraka spermatozoida upotrebljenih u eksperimentima

Neposredno pre ispitivanja spermatozoida, čistoća uzorka je ispitivana i potvrđena upotrebom svetlosnog mikroskopa i odsustvom amplifikacije iRNK za germinativne ćelije, epitelne ćelije i leukocite (Slika 12).



Slika 12. Prisustvo markera za leukocite (CD45), germinativne ćelije (c-kit) i epitelne ćelije (E-cad). Uzorci spermatozoida svih ispitivanih grupa testirani su na prisustvo CD45, c-kit i E-cad. PCR proizvodi reakcije svih uzoraka za svaku grupu su spojeni i naneti na gel u kolone: 1, 5, 9 – kontrolna grupa; 2, 7, 10 – netretirana grupa; 3, 8, 11 – grupa tretirana SOD mimetikom. Nijedan od

ispitivanih uzoraka nije pokazao prisustvo RNK kontaminirajućih ćelija (u linijama 1-3, CD45; 5-7, c-kit; 9-11, E-cad). Kao pozitivna kontrola za CD45 i E-cad korišćeni su monociti i epitelske ćelije endometrijuma, respektivno. Uzorci humane sperme kontaminirani testikularnim germinativnim ćelijama su korišćeni kao pozitivna kontrola za c-kit.

4.2. Pokretljivost spermatozoida

Pokretljivost spermatozoida prikazana je u Tabeli 5. U odnosu na kontrolnu grupu, nakon inkubacije spermatozoida od 3 časa u Tirodovom medijumu, pod nekapacitirajućim uslovima, pokretljivost spermatozoida je statistički značajno smanjena ($p < 0.001$). Tretman SOD mimetikom vraća procenat pokretnih spermatozoida na kontrolni nivo, tako da je pokretljivost spermatozoida u ovoj grupi visoko statistički značajna u odnosu na netretiranu grupu ($p < 0.001$).

Tabela 5. Pokretljivost spermatozoida.

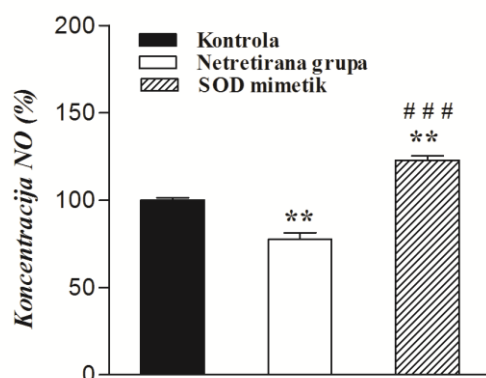
	<i>Kontrolna grupa</i>	<i>Netretirana grupa</i>	<i>SOD mimetik</i>
<i>Pokretni spermatozoidi (%)</i> <i>(sr.vrednost ± SD)</i>	90 ± 4.2	68 ± 3.8***	83 ± 4.5###

*, poređenje sa kontrolnom grupom *** $p < 0.001$; #, poređenje sa netretiranom grupom ### $p < 0.001$.

4.3. Količina NO u spermatozoidima

4.3.1. Nivo NO određen elektrohemijski

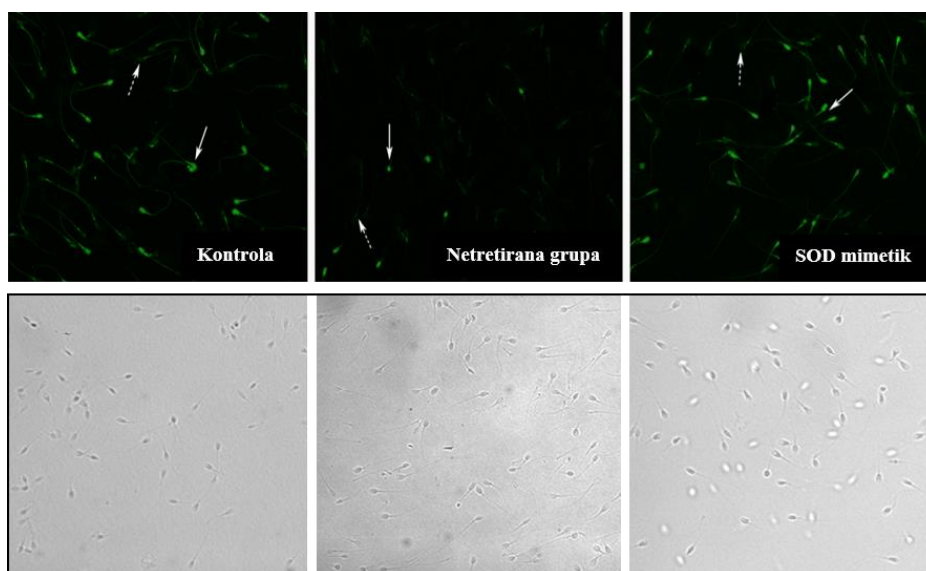
Produkcija NO u suspenziji spermatozoida od 40×10^6 /ml, merena je odmah u realnom vremenu, elektrohemijski, inNO-II azot oksid mernim sistemom, koristeći amino-700 elektrodu. Koncentracija NO u spermatozoidima resuspendovanim u Tirodovom medijumu, koja je merena odmah, kao i koncentracija NO u spermatozoidima inkubiranim 3 časa u Tirodovom medijumu ili u Tirodovom medijumu koji sadrži $50 \mu\text{M}$ SOD mimetik, M40403 predstavljene su na Grafikonu 1. Nivo NO u suspenziji spermatozoida, meren amperometrijskim senzorom, nakon inkubacije u Tirodovom medijumu od 3 časa je značajno smanjen ($p < 0.01$) kada se poredi sa kontrolom. Međutim, u grupi koja je tretirana sa M40403, koncentracija NO je viša nego u kontrolnoj ($p < 0.01$) i netretiranoj ($p < 0.001$) grupi.



Grafikon 1. Koncentracija NO u suspenziji spermatozoida. Relativne koncentracije NO predstavljene su kao procentat od kontrole (100%). Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi). *poređenje sa kontrolnom grupom, ** p<0.01; #poređenje sa netretiranom grupom, ### p<0.001.

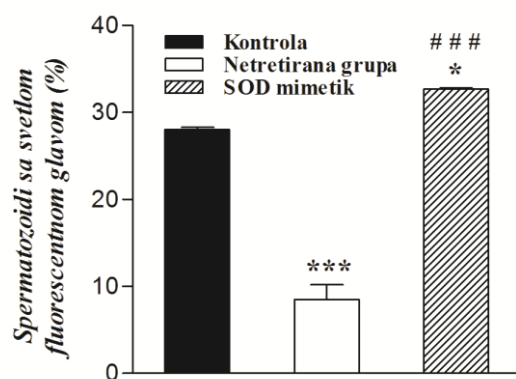
4.3.2. Količina NO određena kvantifikacijom Daf2-DA pozitivnih spermatozoida

Prisustvo i lokalizacija NO u uzorcima spermatozoida, praćena je korišćenjem NO specifične fluorescentne probe Daf2-DA i reprezentativni rezultat, prikazan je na Slici 13. Osim u mitohondrijama, NO-specifična fluorescencija je lokalizovana i u glavi i repu spermatozoida.



Slika 13. Prisustvo i lokalizacija NO u uzorcima spermatozoida. NO pozitivni, spermatozoidi sa svetlom glavom (→); NO negativni, spermatozoidi sa bledom glavom (---). Gornji ram, fluorescentna slika; donji ram, fazni kontrast, uveličanje 63x, original.

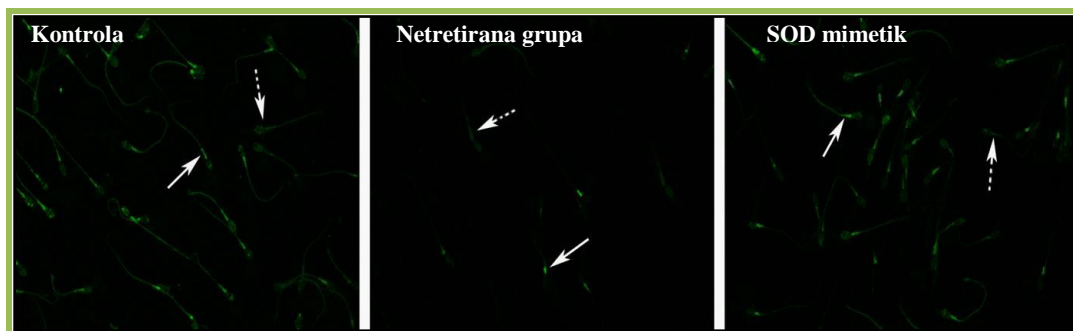
Sadržaj NO u uzorcima je određivan kvantifikacijom Daf2-DA (NO) pozitivnih spermatozoida – spermatozoidima sa svetlim glavama (Grafikon 2). Saglasno amperometrijskim merenjima, inkubacija u Tirodovom medijumu od 3 časa značajno smanjuje ($p < 0.001$) procenat NO pozitivnih spermatozoida u poređenju sa kontrolom. Međutim, procenat spermatozoida sa svetlim glavama (boje se pozitivno na NO) se povećava posle tročasovne inkubacije spermatozoida u Tirodovom medijumu koji sadrži 50 μM M40403 ($p < 0.05$, u poređenju sa kontrolom i $p < 0.001$ u poređenju sa netretiranom grupom).



Grafikon 2. Količina NO u spermatozoidima, dobijena kvantifikacijom sadržaja spermatozoida sa svetlom glavom (pozitivnim na NO) u poređenju sa onima sa bledom glavom (negativnim na NO). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD za 5 uzoraka po grupi. Za svaki uzorak ponaosob analizirano je 200-300 spermatozoida u tri različita polja. *poređenje sa kontrolnom grupom, $*p < 0.05$; *** $p < 0.001$; #poređenje sa netretiranom grupom, ### $p < 0.001$.

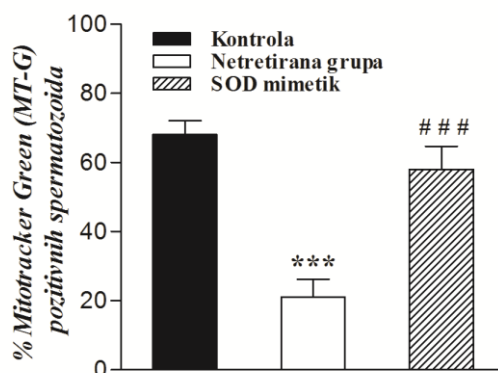
4.4. Funkcioni status mitohondrija

Funkcioni status mitohondrija je ispitivan korišćenjem specifične fluorescentne probe, MT-G, koja se specifično akumulira u mitohondrijama u zavisnosti od transmembranskog elektrohemijskog gradijenta i tako vizuelno razdvaja populaciju spermatozoida na one sa aktivnim i neaktivnim mitohondrijama. Reprezentativni rezultati MT-G bojenja spermatozoida prikazani su na Slici 14.



Slika 14. MT-G bojenje spermatozoida. MT-G pozitivni (→) i MT-G negativni (---) spermatozoidi. Uveličanje: x63, original.

Kvantifikacija MT-G pozitivnih mitohondrija pokazala je da tročasovna inkubacija u Tirodovom medijumu, u poređenju sa kontrolnom grupom, dovodi do značajnog smanjenja populacije spermatozoida sa aktivnim mitohondrijama (MT-G pozitivni spermatozoidi) ($p < 0.001$) (Grafikon 3). Nasuprot tome, tročasovna inkubacija u Tirodovom medijumu koji sadrži SOD mimetik restituiše populaciju MT-G pozitivnih spermatozoida, odnosno održava populaciju na kontrolnom nivou.



Grafikon 3. Procenat MT-G pozitivnih spermatozoida. *poređenje sa kontrolom, *** $p < 0.001$; # poređenje sa netretiranom grupom ### $p < 0.001$.

4.5. Rezultati RT-PCR analiza

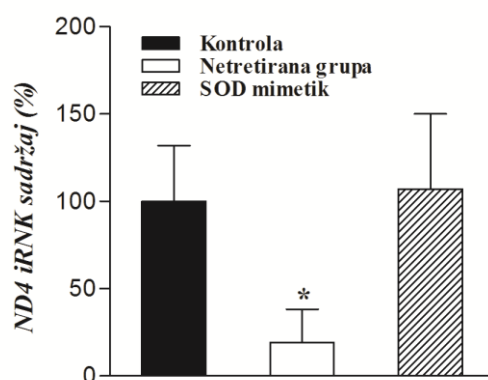
4.5.1. Genska ekspresija komponenti OXPHOS

Tročasovna inkubacija u Tirodovom medijumu značajno smanjuje nivo iRNK komponenti respiratornog lanca koje kodira mitohondrijalni genom: ND4 subjedinica kompleksa I (Grafikon 4), subjedinica II citohrom *c* oksidaze (COX II) (Grafikon 6). Takođe, genska ekspresija komponenti respiratornog lanca kodiranih nukleusnim

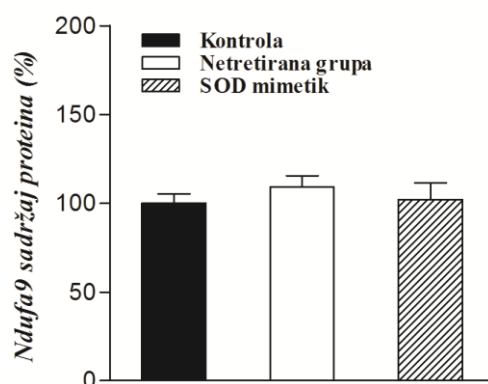
genomom i to subjedinica Ndufa6 kompleksa I (Grafikon 5) i subjedinica IV citohrom *c* oksidaze (COX IV) (Grafikon 6), manja je u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$).

Suprotno ovim rezultatima, tročasovna inkubacija u Tirodovom medijumu koji sadrži SOD mimetik, značajno povećava ekspresiju gena subjedinica kompleksa I i IV, Ndufa6 i COX IV kodiranih nukleusnim genomom ($p < 0.05$) u poređenju sa netretiranom grupom, dok subjedinice ovih kompleksa, koje kodira mitohondrijalni genom vraća na kontrolni nivo.

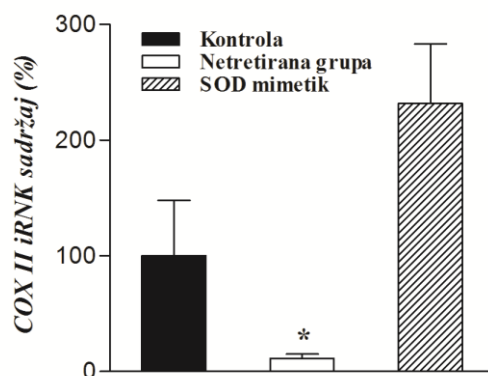
Transkripcioni nivoi citohroma *b* (Grafikon 8) i ATP sintaze (Grafikon 9) bili su nepromenjeni.



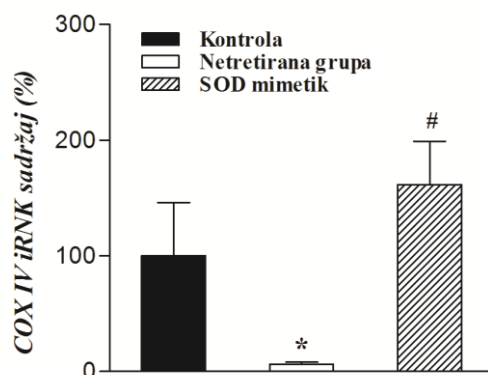
Grafikon 4. Promena količine iRNK za ND4 subjedinicu kompleksa I. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH ($n=30$, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%). *poređenje sa kontrolnom grupom, * $p < 0.05$.



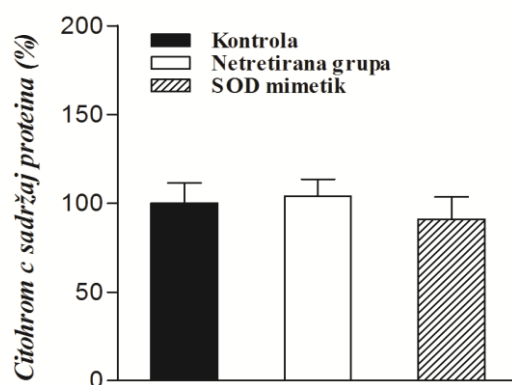
Grafikon 5. Promena količine iRNK za Ndufa6 subjedinicu kompleksa I. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH ($n=30$, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%). *poređenje sa kontrolnom grupom, * $p < 0.05$; #poređenje sa netretiranom grupom, # $p < 0.05$.



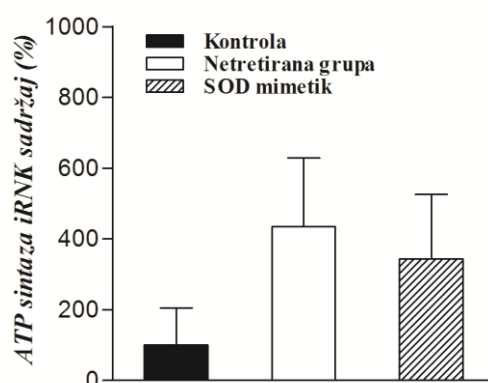
Grafikon 6. Promena količine iRNAK za subjedinicu II citohrom *c* oksidaze (COX II). Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%). *poređenje sa kontrolnom grupom, * p<0.05.



Grafikon 7. Promena količine iRNAK za subjedinicu IV citohrom *c* oksidaze (COX IV). Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%). *poređenje sa kontrolnom grupom, * p<0.05. #poređenje sa netretiranom grupom, # p< 0.05.



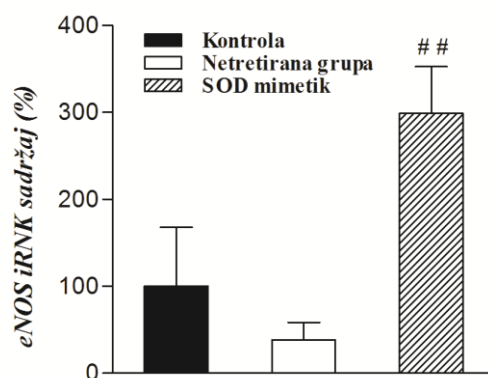
Grafikon 8. Promena količine iRNK za citohrom *b*. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).



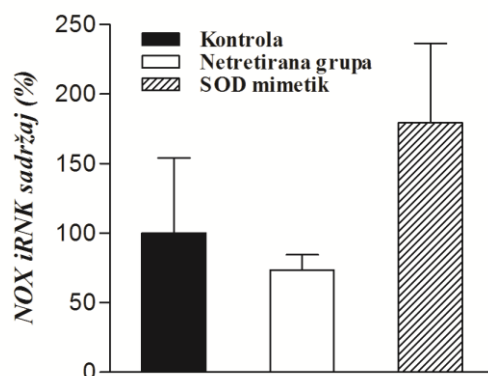
Grafikon 9. Promena količine iRNK za ATP sintazu. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).

4.5.2. Genska ekspresija eNOS i NOX

U odnosu na kontrolu, tročasovna inkubacija spermatozoida u Tirodovom medijumu nije afektovala gensku ekspresiju enzima koji su uključeni u proizvodnju NO i $O_2^{\cdot-}$, eNOS (Grafikon 10) i NOX (Grafikon 11). Međutim, SOD mimetik značajno povećava nivo iRNK za eNOS u odnosu na netretiranu grupu ($p < 0.01$), dok nema efekta na ekspresiju NOX gena. Sa druge strane, inkubacija spermatozoida u Tirodovom medijumu ili u Tirodovom medijumu koji je sadržao SOD mimetik, nije uticala na ekspresiju nNOS, dok genska ekspresija iNOS u uzorcima nije detektovana (rezultati nisu prikazani).



Grafikon 10. Sadržaj iRNAK za eNOS. [#]poređenje sa netretiranom grupom, ^{##} $p < 0.01$. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).

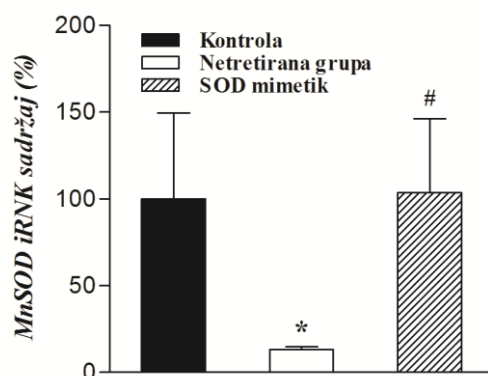


Grafikon 11. Sadržaj iRNAK za NOX. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).

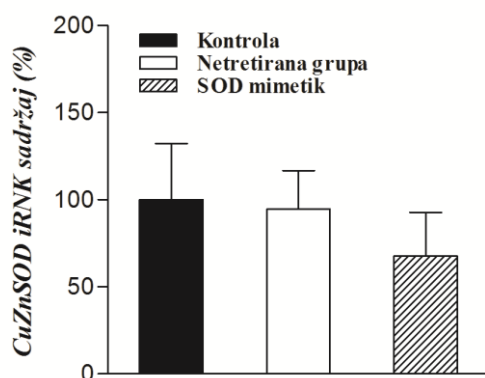
4.5.3. Genska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

Promene genske ekspresije enzima antioksidativne odbrane humanih spermatozoida prikazane su na Grafikonima 12-15.

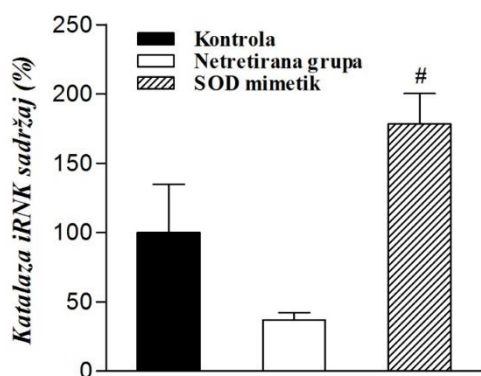
Genska ekspresija MnSOD (Grafikon 12) i GSH-Px (Grafikon 15) niža je u netretiranoj grupi nego u kontrolnoj grupi ($p < 0.05$), dok je genska ekspresija CuZnSOD i katalaze (Grafikon 14 i 15) nepromenjena nakon inkubacije u Tirodovom medijumu 3 sata. Tretman M40403 SOD mimetikom povećava sadržaj iRNAK za MnSOD i katalazu u poređenju sa netretiranom grupom ($p < 0.05$), ali nema uticaj na sadržaj iRNAK za CuZnSOD ili GSH-Px.



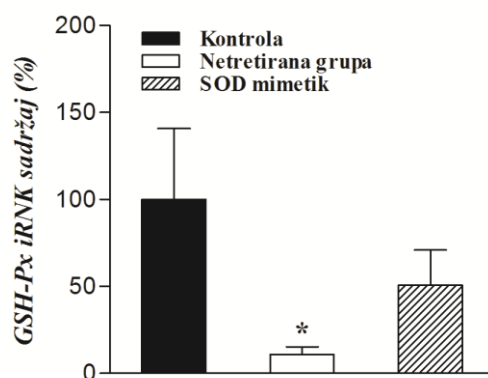
Grafikon 12. Sadržaj iRNA za MnSOD. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%). *poređenje sa kontrolom, * p<0.05; #poređenje sa netretiranom grupom, # p<0.05.



Grafikon 13. Sadržaj iRNA za CuZnSOD. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).



Grafikon 14. Sadržaj iRNA za katalazu. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%). #poređenje sa netretiranom grupom, # p<0.05.



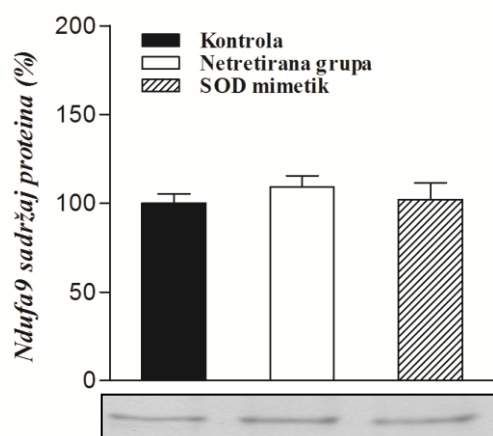
Grafikon 15. Sadržaj iRNK za GSH-Px. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD normalizovani prema GAPDH (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole. (100%). *poređenje sa kontrolom, * p<0.05.

4.6. Rezultati Western blot analize

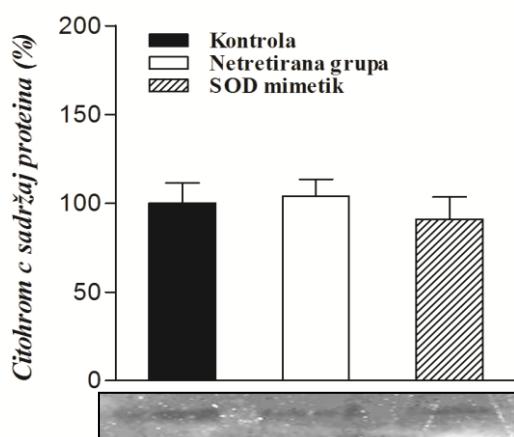
4.6.1. Proteinska ekspresija komponenti OXPHOS

Nakon tročasovne inkubacije spermatozoida u Tirodovom medijumu ili u Tirodovom medijumu koji je sadržao SOD mimetik, nije došlo do promena nivoa proteinske ekspresije subjedinice Ndufa9 kompleksa I (Grafikon 16), citohroma *c* (Grafikon 17) i kompleksa III (Grafikon 18) komponenti respiratornog lanca, dok je proteinska ekspresija subjedinica IV kompleksa IV (Grafikon 19), bila smanjena u odnosu na kontrolu (p<0.01).

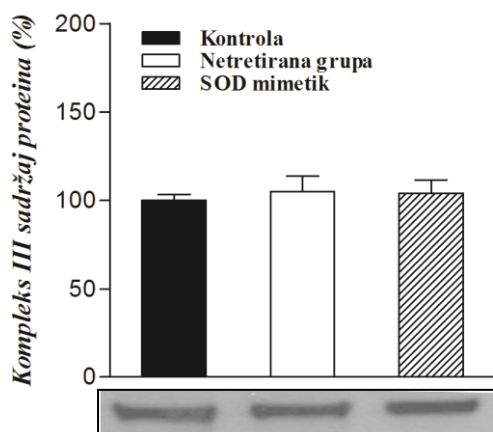
Sa druge strane, inkubacija u Tirodovom medijumu koji je sadržao SOD mimetik je dovela do značajnog smanjenja proteinske ekspresije COX IV, kodiranog nukleusnim genomom, u odnosu na kontrolu (p<0.001) i u odnosu na netretiranu grupu (p<0.05).



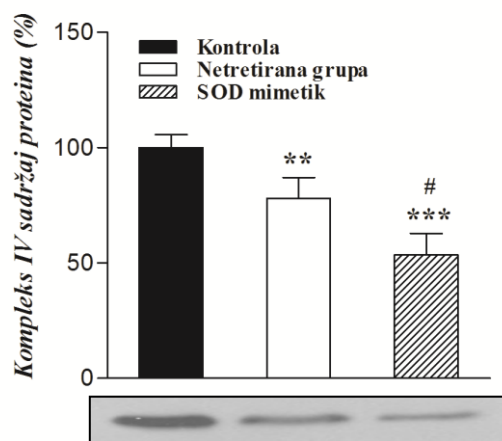
Grafikon 16. Sadržaj proteina za Ndufa9. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).



Grafikon 17. Sadržaj proteina za citohrom c. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).



Grafikon 18. Sadržaj proteina za kompleks III. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).

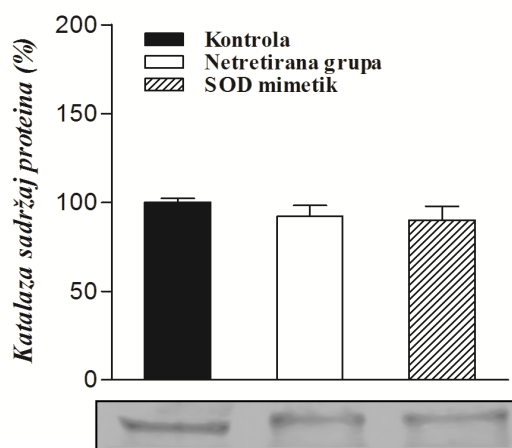


Grafikon 19. Sadržaj proteina za kompleks IV. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%). *poređenje sa kontrolom, *** p<0.001; #poređenje sa netretiranom grupom, # p<0.05.

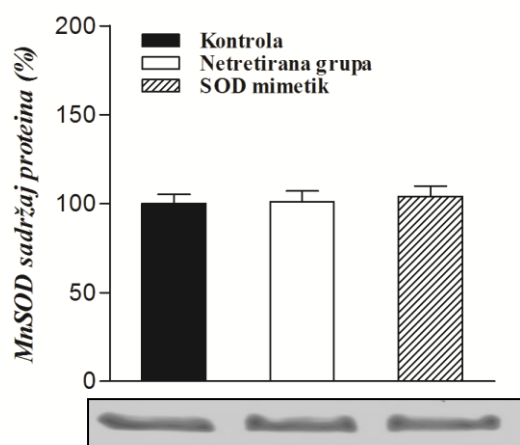
4.6.2. Proteinska ekspresija enzima antioksidativne odbrane

Promene proteinske ekspresije enzima antioksidativne odbrane humanih spermatozoida prikazane su na Grafikonima 20-22.

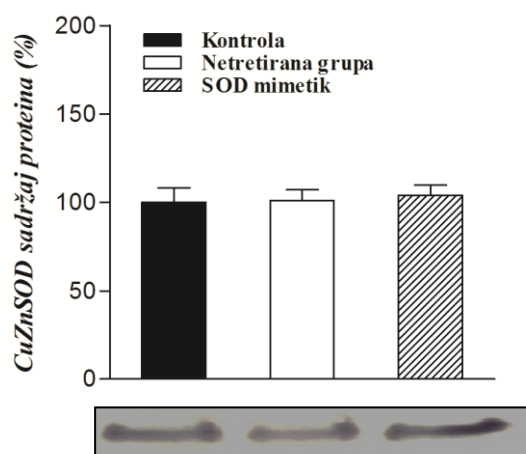
Tročasovna inkubacija u Tirodovom medijumu kao i u Tirodovom medijumu koji je sadržao SOD mimetik, nije uticala na proteinsku ekspresiju katalaze (Grafikon 20), MnSOD (Grafikon 21), CuZnSOD (Grafikon 22).



Grafikon 20. Sadržaj proteina za katalazu. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).



Grafikon 21. Sadržaj proteina za MnSOD. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).



Grafikon 22. Sadržaj proteina za CuZnSOD. Rezultati su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=30, 10 po grupi) i prikazani kao procenat od kontrole (100%).

4.7. Ispitivanja semene plazme

4.7.1. Karakteristike uzoraka semena za analize semene plazme

U Tabeli 6 prikazane su karakteristike 10 nativnih uzoraka semena normozoospermičnih pacijenata (pre centrifugiranja od 30 minuta na 3000g), koji su prikupljeni i korišćeni za istraživanje, nakon dobijanja pisane saglasnosti o pristanku pacijenta.

Tabela 6. Karakteristike uzoraka sa srednjom vrednošću i starosti donora.

<i>Parametri</i>	<i>Srednja vrednost + SD (10 uzoraka)</i>	<i>Minimum / maksimum</i>
Starost donora (godina)	31.80 ± 1.82	25/34
Period apstinencije (dan)	4.1 ± 0.44	3/5
Volumen semena (ml)	3.37 ± 0.19	2.5/4.5
Koncentracija spermatozoida (10 ⁶ /ml)	81.90 ± 8.84	30/130
Pokretljivost (%)	60.00 ± 2.01	50/70
Normalna morfologija (%)	36.60 ± 2.09	30/50
Broj leukocita	3.10 ± 0.69	2/6
Broj eritrocita	(-) odsutni	(-) odsutni

4.7.2. Korelacija između funkcionalnih parametara spermatozoida (broj, progresivna pokretljivost i morfologija) i ekspresije/aktivnosti proteina antioksidativne odbrane u semenoj plazmi

Rezultati prikazani u Tabeli 7 su pokazali da je progresivna pokretljivost spermatozoida bila u pozitivnoj korelaciji sa proteinskom ekspresijom enzima antioksidativne odbrane semene plazme, i to sa ekspresijom obe izoforme superoksid dismutase, MnSOD ($r=0.797$, $P<0.01$) i CuZnSOD ($r=0.908$, $p<0.01$), kao i katalaze ($r=0.789$, $p<0.01$).

Takođe je opažena pozitivna korelacija između broja spermatozoida, koncentracije spermatozoida i MnSOD proteinske ekspresije ($r=0.843$, $p<0.01$), kao i između morfologije spermatozoida i proteinske ekspresije katalaze ($r=0.603$, $p<0.1$) u semenoj plazmi.

Nasuprot tome, ekspresija proteina GSH-Px nije pokazala korelaciju ni sa jednim parametrom sperme, dok je aktivnost ovog enzima u negativnoj korelaciji sa morfologijom ($r= -0.601$, $p<0.1$) i pokretljivošću spermatozoida ($r= -0.705$, $p<0.05$), (Tabela 8).

Tabela 7. Korelacija između funkcionalnih parametara spermatozoida semena i relativne proteinske ekspresije enzima antioksidativne odbrane semene plazme.

	CuZnSOD	MnSOD	GSH-Px	Katalaza
Broj spermatozoida (10^6)	r = 0.538 P = 0.109 NS	r = 0.843 P = 0.002 ***	r = 0.359 P = 0.308 NS	r = 0.502 P = 0.139 NS
Progresivna pokretljivost spermatozoida (%)	r = 0.502 P = 0.139 NS	r = 0.502 P = 0.139 NS	r = 0.403 P = 0.248 NS	r = 0.403 P = 0.248 NS
Morfologija spermatozoida (%)	r = 0.403 P = 0.248 NS	r = 0.307 P = 0.388 NS	r = -0.118 P = 0.248 NS	r = 0.603 P = 0.066 *

Značajnost: NS, bez značajnosti; * $p < 0.1$; *** $p < 0.01$.

Tabela 8. Korelacija između funkcionalnih parametara spermatozoida i aktivnosti antioksidativnih enzima semene plazme.

	CuZnSOD	GSH-Px	GSH
Broj spermatozoida (10^6)	r = 0.094 P = 0.796 NS	r = -0.179 P = 0.621 NS	r = 0.422 P = 0.224 NS
Progresivna pokretljivost spermatozoida (%)	r = 0.288 P = 0.420 NS	r = -0.705 P = 0.023 **	r = 0.255 P = 0.477 NS
Morfologija spermatozoida (%)	r = 0.405 P = 0.246 NS	r = -0.601 P = 0.066 *	r = 0.314 P = 0.377 NS

Značajnost: NS, bez značajnosti; * $p < 0.1$; ** $p < 0.05$.

5. Diskusija

Neploidnost je jedan od velikih problema u medicini u svetu. Tokom poslednjih godina uočeno je dramatično povećanje neploidnosti kod muškaraca, a predviđanja su da će se stopa duplirati u narednoj deceniji. Savremen način života, društveni faktori i uticaj spoljašnje sredine doprinose smanjenju reproduktivne sposobnosti. Smatra se da se približno 40% neploidnosti jednog para može pripisati muškom faktoru (Sharlip i sar., 2002).

Mikroskopska analiza uzorka semena muškaraca (spermogram) je i dalje osnov, zlatni standard za procenu (ne)plodnosti. Osnovni parametri kojima se predviđa funkcionalnost i fertilizacioni potencijal spermatozoida su broj, pokretljivost i morfologija. Ipak, postoje muškarci sa potvrđeno dobrim karakteristikama semena ali sa smanjenom fertilizacionom sposobnošću, kao i muškarci koji su ostvarili potomstvo ali su im loši osnovni parametri funkcionalnosti spermatozoida. Kako su ovi parametri promenljivi pojavila se potreba za novim dijagnostičkim markerima kao i neophodnost da se dosadašnji pristupi u lečenju steriliteta poboljšaju.

Brojna istraživanja su pokazala da su procesi ključni za normalno funkcionisanje spermatozoida redoks senzitivni (de Lamirande i sar., 2009). Izmene u nivou NO i $O_2^{\cdot-}$, kao i u njihovom odnosu, mogu doprineti razvoju neploidnosti kod muškaraca. Stoga su ispitivanja terapije steriliteta fokusirana na održanje fiziološkog nivoa ovih redoks molekula. U te svrhe korišćeni su mnogobrojni modulatori redoks stanja, od antioksidanata do donora i prekursora NO (Hellstrom i sar., 1994; Lewis i sar., 1996; Bolanos i sar., 2008). Poslednjih godina efekat mimetika SOD je testiran u različitim patološkim procesima: zapaljenju, srčanoj disfunkciji, arterosklerozi, hipertenziji i kanceru (Salvemini i sar., 2002; Vallance i Leiper, 2002). Pentaazamakrociklični Mn(II) mimetik SOD, M40403 je potentan SOD mimetik koji ne pokazuje peroksidazno/katalaznu aktivnost, selektivno uklanja $O_2^{\cdot-}$ i ne reaguje sa NO. Mogući potencijal M40403 u tretmanu steriliteta i redoks promene u spermatozoidima indukovane SOD mimetikom biće diskutovane u disertaciji.

Rezultati disertacije pokazuju da posle tročasovne inkubacije humanih spermatozoida u Tirodovom medijumu, pod nekapacitirajućim uslovima, dolazi do smanjenja njihove pokretljivosti, procenta MT-G pozitivnih mitohondrija, koncentracije

NO, ekspresije komponenti elektron transportnog lanca (kompleksa I i IV) i enzima antioksidativne odbrane (MnSOD i GSH-Px). S obzirom da navedeni uslovi odgovaraju onim koji se koriste u postupku IVF, dobijeni rezultati sugerišu moguća mesta delovanja (na molekularskom nivou) u cilju poboljšanja funkcionalnosti spermatozoida u postupku asistiranog oplodnje. Takođe, oni u prvi plan ističu narušenu redoks homeostazu i ukazuju na moguću značaj primene modulatora redoks stanja. U skladu sa tim, tretman spermatozoida SOD mimetikom (M40403) normalizuje pokretljivost spermatozoida i populaciju MT-G pozitivnih mitohondrija i povećava sadržaj NO i ekspresiju kompleksa I i IV mitohondrijalnog elektron transportnog lanca. Ovi efekti praćeni su povećanjem ekspresije iRNK za eNOS, MnSOD i katalazu.

Činjenica da tretman SOD mimetikom poboljšava pokretljivost spermatozoida ukazuje da M40403 ima pozitivan efekat na funkcionalnost i kvalitet semena. Poznato je da u osnovi pokretljivosti spermatozoida leži povećanje produkcije energije u mitohondrijama (Agarwal i sar., 2008). Tako suplementacija sukcinatom, supstratom kompleksa II, indukuje povećanje (Folgero i sar., 1993), dok različiti inhibitori elektron transportnog lanca vode smanjenju pokretljivosti spermatozoida (Ruiz-Pesini i sar., 2000; St John i sar., 2005). Kako je broj mitohondrija u spermatozoidima konstantan, funkcionalni status može biti posledica samo promene aktivnosti postojećih organela. Poznato je da uzorci spermatozoida sa većim procentom aktivnih mitohondrija imaju viši fertilizacioni potencijal i da određivanje mitohondrijalne aktivnosti preko MT-G bojenja, može biti dobar metod za selekciju najpotentnijeg/funkcionalnijeg spermatozoida u asistiranom fertilizacionu (Sousa i sar., 2011). S obzirom na to da rezultati disertacije pokazuju da SOD mimetik povećava broj MT-G pozitivnih spermatozoida, može se zaključiti da ovaj modulator redoks stanja poboljšava funkcionalni status mitohondrija u spermatozoidima, a samim tim i njihov kvalitet.

Literaturni podaci pokazuju pozitivnu korelaciju između kvaliteta sperme i ekspresije mitohondrijalnih proteina respiratornog lanca (Kao i sar., 1995; Amaral i sar., 2007). U disertaciji je zapaženo da M40403 povećava iRNK ekspresiju nuklearno kodiranih subjedini kompleksa I i IV elektron transportnog lanca, u odnosu na netretiranu grupu. Ovi podaci pokazuju da promene u redoks statusu spermatozoida, posle tretmana SOD mimetikom, afektuju transkripciju nuklearnih gena koji kodiraju mitohondrijalne proteine. Takođe, ovi rezultati pružaju podršku postojećoj hipotezi o

pozitivnom efektu SOD mimetika na energetski status mitohondrija i sa tim u vezi, fertilizacionu sposobnost spermatozoida.

Iako precizni molekularni mehanizmi kojima SOD mimetik ostvaruje pozitivne efekte na funkcionost mitohondrija nisu u potpunosti razjašnjeni, rezultati disertacije ukazuju na uključenost NO. Naime, istovremeno povećanje koncentracije NO produkovanog u spermatozoidima sugerise njegovu direktnu uključenost u regulaciji procesa koji leže u osnovi veće i bolje pokretljivosti, pre svega na povećanje produkcije energije u mitohondrijama pod tretmanom SOD mimetikom. Poznato je da NO afektuje mitohondrije na strukturnom nivou regulišući njihovu biogenezu i remodeliranje, a na funkcionom nivou regulišući mitohondrijalnu respiraciju, dopremanje supstrata i kiseonika (Nisoli i sar., 2003; Petrović i sar., 2008; 2010). Za spermatozoide je pokazano da NO (ili NO zavisne vrste) imaju pozitivne efekte na energetski status u mitohondrijama i njihovu pokretljivost (Hellstrom i sar., 1994). Pored zasebnog delovanja, NO regulise mnogobrojne funkcije u okviru muškog polnog sistema i kroz zajedničko delovanje sa $O_2^{\bullet-}$ (de Lamirante i sar., 2009). NO brzo reaguje sa $O_2^{\bullet-}$, čak trostruko većom stopom nego što je brzina reakcije dismutacije katalizovana SOD (Huie i Padmaja, 1993). Jasno je da povećana interakcija između ove dve reaktivne vrste može dovesti do smanjenja biodostupnosti NO i samim tim narušavanja NO-zavisne signalne transdukcije. Stoga, povećan nivo NO kod spermatozoida koji su tretirani mimetikom može biti posledica snižavanja koncentracije $O_2^{\bullet-}$ zbog delovanja M40403. Uz to, povećana količina NO kod spermatozoida tretiranih M40403 praćena je povećanom ekspresijom iRNK za eNOS sugerišući da SOD mimetik indukuje povećanje novoa NO i preko stimulacije njegove endogene produkcije. Mnogi literaturni podaci pokazuju značaj ove izoforme NOS za normalno sazrevanje i funkcionisanje spermatozoida (Burnett i sar., 1996; Zini i sar., 1996; 1998; 1999; O'Bryan i sar., 1998; Revelli i sar., 1999; Lee i Cheng, 2008). Stimulatorni efekat SOD mimetika na ekspresiju NOS izoformi pokazan je ranije u hipokampusu dijabetičnih pacova (Stančić i sar., 2013). Nije poznato koji mehanizam leži u osnovi ovakvog efekta mimetika na ekspresiju NOS. Literaturni podaci ukazuju da se on može vezati za H_2O_2 , produkt reakcije dismutacije $O_2^{\bullet-}$ sa M40403. Sa jedne strane vodonik peroksid može stimulisati eNOS (Cai i sar., 2001; Searles, 2006), ali izmenjen redoks status usled smanjenja koncentracije $O_2^{\bullet-}$ može takođe indukovati taj odgovor (Srinivasan i sar., 2004).

S obzirom da su eksperimentalni uslovi u disertaciji istovetni sa onima koji se primenjuju tokom IVF, po našem saznanju, ovo je prvi put da je pokazan stimulatorni efekat ove klase SOD mimetika na sadržaj NO i gensku ekspresiju eNOS kod spermatozoida. Iako su mnoga pitanja koja se odnose na mehanizme delovanja SOD mimetika i dalje bez odgovora, rezultati nam dopuštaju da pretpostavimo da se M40403 može koristiti kao sredstvo za manipulaciju redoks stanja spermatozoida, tako što uklanja $O_2^{\cdot-}$ i stimuliše edogenu produkciju NO.

Modulacija redoks okruženja spermatozoida upotrebom SOD mimetika u disertaciji je pokazana i posredstvom povećanja nivoa iRNK za katalazu i MnSOD, u poređenju sa netretiranom grupom. Naime, može se reći da SOD mimetik, pored toga što direktno uklanja $O_2^{\cdot-}$, reguliše nivo reaktivnih vrsta preko regulacije endogene antioksidativne odbrane u spermatozoidima. Kao što je istaknuto, povećani oksidativni pritisak nalazi se u osnovi mnogih patoloških stanja uključujući sterilitet (Alvarez i Storez, 1995; Baker i sar., 1996). Stoga su poslednjih godina ispitivanja terapije steriliteta usmerena na mogući potencijal antioksidanata. Dobijeni rezultati su različiti, dok neki pokazuju pozitivne efekte kod tretmana neplodnosti muškaraca, drugi ukazuju na suprotno (Dawson i sar., 1992; Kessopoulou i sar., 1995; Huges i sar., 1998; Rolf i sar., 1999). S obzirom na to da tretman M40403 u ovoj disertaciji vraća narušeni nivo iRNK za MnSOD i GSH-Px na kontrolni, što pozitivno korelira sa prethodno navedenim pozitivnim efektima na funkcionalnost spermatozoida, može se reći da SOD mimetici pokazuju potencijal u terapiji steriliteta. Indukcija ekspresije gena specifičnih mitohondrijalnih enzima koji uklanjaju $O_2^{\cdot-}$ u prisustvu M40403, gledano iz drugog ugla, postavlja novu hipotezu, da postoji neophodnost održanja optimalnog nivoa endogenog sadržaja MnSOD u mitohondrijama spermatozoida. Uprkos činjenici da izoenzimi SOD katalizuju istu reakciju, u ćeliji je funkcija pojedinih izoformi različita i jedna ne može zameniti drugu (Kim i sar., 2005). To ukazuje da je subćelijska lokalizacija izoformi SOD od izuzetnog značaja za fiziološko funkcionisanje enzima. Tome u prilog ide još i činjenica da je transkripcioni nivo CuZnSOD nakon tretmana M40403 ostao nepromenjen. U disertaciji se uočeno povećanje u ekspresiji katalaze može posmatrati kao fenotipska prilagodljivost enzima usmerena da ukloni povećane količine H_2O_2 produkovanog SOD mimetikom. Dobijeni rezultati ukazuju na koordinisanu regulaciju ekspresije iRNK za MnSOD i katalazu indukovanu SOD

mimetikom. Koordinisana ekspresija enzima koji uklanjaju $O_2^{\cdot-}$ sa enzimima koji uklanjaju H_2O_2 ključna je za održanje unutarćelijskog redoks statusa.

Rezultati disertacije izbacuju u fokus jednu važnu činjenicu koja ukazuje da SOD mimetik menja transkripcione nivoe različitih mitohondrijalnih proteina, bilo nukleusno ili mitohondrijalno kodiranih. To može biti u suprotnosti sa sadašnjim, u literaturi preovladajućim mišljenjem da su spermatozoidi transkripciono utišane ćelije, makar za proteine kodirane genima u nukleusu. Razlog tome je građa hromatina spermatozoida koji je visoko kondenzovan, gde su histoni zamenjeni malim, visoko baznim proteinima, protaminima (Miller i sar., 2010). Zato se govori o koncenzusu da ejakulirani spermatozoidi nemaju transkripcionu aktivnost u nukleusu, da su transkripciono „utišani“ i da su različite RNK koje se u njima detektuju citoplazmatski ostaci iz različitih faza spermatogeneze ili su rezultat kontaminacije somatskim ćelijama (Hamatani, 2012).

Rezultati disertacije isključuju drugu mogućnost. Pažljivo sprovedeni eksperimentalni protokoli i naknadne PCR analize pokazuju da uzorci spermatozoida nisu kontaminirani leukocitima ili drugim (epitelskim) ćelijama. Promene nivoa iRNK za mitohondrijalne proteine i enzime antioksidativne odbrane, bilo da govorimo o smanjenju ili povećanju, odraz su aktivnosti u samim spermatozoidima. Uz to, dogma o transkripcionoj „utišanosti“ i da su RNK u spermatozoidima samo citoplazmatski ostaci davno je dovedena u sumnju (Pessot i sar., 1989). Pokazano je prisustvo različitih vrsta RNK u nukleusima spermatozoida pacova i ljudi (Miller i sar., 1999; Ostermeier i sar., 2002; Ostermeier i sar., 2005; Shah i sar., 2005; Amanai i sar., 2006; Boerke i sar., 2007; Lalancette i sar. 2008; Yan i sar., 2008) kao i prisustvo iRNK u mitohondrijama (Kumar i sar., 1993; Modi i sar., 2005; Gur i Breitbart, 2006). Šta više, pokazana je transkripciona i translaciona aktivnost zrelih spermatozoida što ukazuje da detektovani iRNK molekuli nisu samo nefunkcioni ostaci iz spermatogeneze (Miteva i sar., 1995; Naz, 1998; Gur i Breitbart, 2006). Osim toga, u zrelih spermatozoidima transkripcija je aktivna u mitohondrijama, koje sintetišu i mitohondrijalno kodirane RNK (MacLaughlin i Turner, 1973) i proteine (Premkumar i Bhargava, 1972). Pokazana je i translacija nukleusno kodiranih proteina na mitohondrijalnim ribozomima, lociranim u ili izvan mitohondrija (Gur i Breitbart, 2006). Imajući u vidu i činjenicu da svi histoni nisu zamenjeni protaminima i da hromatin zrelih spermatozoida zadržava 15% strukture sa

histonima u tipičnoj nukleozomalnoj organizaciji, uz postojanje transkripciono aktivnih mesta (Allen i sar., 1996; Zalenskaya i sar., 2000), rezultati disertacije su dodatan doprinos razumevanju ovih fundamentalnih procesa molekularne biologije.

Evaluacija fertilizacionog potencijala uzorka semena muškaraca ukazuje da status plodnosti ne može biti zasnovan samo na vrednostima osnovnih parametara spermatozoida. Sami parametri su promenljivi u vremenu, tako da nalaz spermograma kod istog muškaraca može biti različit. Zato je neophodno da se pronađu i utvrde dodatni parametri koji bi predvideli i definisali funkcioni kapacitet spermatozoida. Takođe, postoje osobe koje nisu ostvarile potomstvo iako parametri spermograma pokazuju da su fertilizaciono sposobni, a nasuprot njima postoje osobe koje su ostvarile potomstvo sa slabim karakteristikama semena. Iz ovoga proizlazi da je etiologija neplodnosti slabo razumljiva i da bi bitni događaji na molekulskom nivou u spermatozoidima i u semenoj plazmi mogli biti veoma važni za mušku neplodnost. Iz ovih razloga, jedan od najvažnijih ciljeva u reproduktivnoj biologiji danas je determinacija novih potencijalnih biomarkera neplodnosti muškaraca. Nedavno je pokazano da proteini semene plazme mogu služiti kao važni biomarkeri za neplodnost muškaraca (Sharma i sar., 2013). Osim toga, funkcionalna proteomska analiza otkriva proteine koji su prekomerno ili nedovoljno istraženi u semenoj plazmi sa slabim kvalitetom spermatozoida. Tako je jedan od imperativa disertacije pokušaj da se stekne uvid u mehanizme neplodnosti muškaraca iz perspektive moguće važnosti profila proteinske ekspresije enzima antioksidativne odbrane u semenoj plazmi pri korelaciji sa funkcionalnim parametarima spermatozoida.

Rezultati disertacije pokazuju da proteinska ekspresija CuZnSOD, MnSOD i katalaze u semenoj plazmi korelira sa specifičnim kvalitativnim parametrima semena. Takođe, pokazana je negativna korelacija između aktivnosti GSH-Px i njihove morfologije i progresivne pokretljivosti spermatozoida. Ovi rezultati bacaju novo svetlo na komponente antioksidativne odbrane semene plazme kao potencijalne molekulske markere statusa plodnosti muškaraca.

Povezanost između aktivnosti antioksidativnih enzima i kvaliteta spermatozoida je do sada puno istraživana, ali su dobijeni kontraverzni rezultati (Kobayashi i sar., 1991; Zini i sar., 1993; Sanocka i sar., 1996; Suleiman i sar., 1996; Alkan i sar., 1997; Józwick i sar., 1997; Lewis i sar., 1997; Miesel i sar., 1997; Sanocka i sar., 1997).

Rezultati koji ukazuju na negativnu korelaciju između aktivnosti GSH-Px semene plazme i morfologije spermatozoida su u saglasnosti sa drugim autorima (Atig i sar., 2012). Međutim, negativna korelacija između aktivnosti GSH-Px i pokretljivosti spermatozoida koja je pokazana u disertaciji nije u skladu sa podacima koje su objavili isti autori (Atig i sar., 2012). Pozitivna korelacija između aktivnosti GSH-Px semene plazme i kvaliteta spermatozoida pokazana je i u drugim studijama (Giannattasio i sar., 2002; Dandekar i sar., 2002; Hsieh i sar., 2006).

Sa druge strane, rezultati disertacije ukazuju na dobru korelaciju između količine proteina antioksidativnih enzima u semenoj plazmi sa parametrima semena. Oni sugeriraju da bi nivo proteina antioksidativne odbrane u semenoj plazmi mogao koristiti kao parametar statusa plodnosti muškaraca. Naime, pokazana je pozitivna korelacija između proteinskog nivoa MnSOD i broja i progresivne pokretljivosti spermatozoida; katalaze i pokretljivosti i morfologije spermatozoida, kao i CuZnSOD i morfologije spermatozoida. Ova snažna korelacija između količine MnSOD, CuZnSOD i katalaze i kvalitativnih parametara jasno ilustruje važnost ovih proteina u predikciji (ne)plodnosti muškaraca. U svetlu značaja proteina semene plazme u funkciji spermatozoida, ovi rezultati mogu biti važni i za razvoj novih molekulskih markera neplodnosti muškaraca.

Ovi rezultati su značajni za pronalaženje novih pristupa u određivanju kvaliteta semena i mogu pružiti više informacija naročito u slučajevima idiopatske neplodnosti muškaraca. Osim toga, to bi moglo biti od pomoći za selekciju najpotentnijeg spermatozoida za *in vitro* oplodjenje i poboljšanje ishoda potpomognutog oplodjenja. Još jedna važna činjenica je da su enzimi antioksidativne odbrane u semenoj plazmi određeni Western blot-om, neinvazivnom metodom lako primenljivom u većini laboratorija.

Uzeti zajedno, prikazani rezultati pokazuju da procena nivoa enzima antioksidativne odbrane u semenoj plazmi može biti od prognostičkog značaja u evaluaciji statusa plodnosti muškaraca i mogla bi se koristiti kao dodatni biomarker zajedno sa standardnom analizom u proceni kvaliteta semena. Naravno, budući eksperimenti koji bi uključivali veći broj uzoraka, spermatozoide različitih patologija, kao i uzorke semena neplodnih muškaraca, su potrebni da bi se potvrdili ovi nalazi.

Kako je fokus našeg istraživanja bio postavljen u kontekst fundamentalnih saznanja o redoks regulaciji u humanim spermatozoidima, rezultati disertacije

upotpunjuju saznanja o redoks procesima u reproduktivnoj biologiji koja bi mogla pomoći razvoju novih farmakoloških strategija za lečenje neplodnosti, što bi se postiglo selektivnom proizvodnjom odnosno uklanjanjem određenih reaktivnih vrsta, upotrebom novih redoks modulatora. Takođe, rezultati disertacije sugerišu da bi se SOD mimetici mogli koristiti u cilju poboljšanja funkcije spermatozoida u postupku asisitirane fertilizacije.

6. Zaključci

Rezultati doktorske disertacije doprinose boljem poznavanju fundamentalnih mehanizama redoks regulacije humanih spermatozoida i moguće terapijske primene SOD mimetika, M40403 u prevazilaženju problema neplodnosti koji su vezani za spermatozoide. Mimetik, svojom specifičnom superoksid dismutaznom aktivnošću, uklanjajući $O_2^{\cdot-}$, modulira redoks sredinu u ćelijama i izvan njih, prevashodno preko povećanja biodostupnosti i sinteze NO.

Na osnovu dobijenih rezultata može se tvrditi da primena SOD mimetika poboljšava funkcioni kapacitet spermatozoida, posebno energetski, vezan za mitohondrijalnu aktivnost. Na to ukazuju sledeći rezultati:

- Inkubacija spermatozoida u Tirodovom medijumu (tri sata pod nekapacitirajućim uslovima) praćena je smanjenjem pokretljivosti spermatozoida. Pri istim uslovima, tretman SOD mimetikom restaurira pokretljivost spermatozoida, kao jedan od ključnih parametara kvaliteta spermatozoida za IVF;
- Paralelno, posle inkubacije spermatozoida u Tirodovom medijumu dolazi do smanjenja količine NO u medijumu, dok mimetik ne samo da restaurira nivo NO već je njegova koncentracija iznad nivoa u poređenju sa kontrolnim spermatozoidima (pre inkubacije);
- Mimetik ostvaruje isti efekat i na količinu NO određivanu u spermatozoidima;
- Rezultat da SOD mimetik indukuje ekspresiju eNOS ukazuje da je povećanje koncentracije NO u inkubacionom medijumu i samim spermatozoidima rezultat indukcije endogene sinteze NO, a ne samo povećanja njegove biodostupnosti usled smanjenja koncentracije $O_2^{\cdot-}$ kojeg uklanja mimetik.
- SOD mimetik održava populaciju Mitotracker Green FM (MT-G) pozitivnih spermatozoida na kontrolnom nivou, što je od posebne važnosti za determinaciju aktivnih, funkcionalnih mitohondrija tokom asistirane reprodukcije budući da ti spermatozoidi imaju veći fertilizacioni potencijal;
- Tretman spermatozoida SOD mimetikom dovodi do restauracije ekspresije nukleusno kodiranih subjedinica kompleksa I (Ndufa6) i IV (COX IV) elektron transportnog lanca;

- Povećanje genske ekspresije MnSOD i katalaze ukazuje da SOD mimetik modulira redoks stanje u spermatozoidima dodatno sinhronizujući put uklanjanja $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 .

Rezultati disertacije koji se odnose na ispitivanje korelacije parametara spermatozoida i enzima antioksidativne odbrane u seminalnoj plazmi ukazuju da se oni mogu koristiti kao mogući biomarkeri u analizi kvaliteta spermatozoida.

Može se kazati da rezultati doktorske disertacije predstavljaju dobru polaznu osnovu za dalja istraživanja moguće terapijske primene SOD mimetika, M40403, u terapiji neplodnosti kod muškaraca preko poboljšanja funkcionalnih parametara spermatozoida i njihove mitohondrijalne aktivnosti.

Primena SOD mimetika može biti relevantno farmakološko sredstvo (strategija) u asistiranoj fertilizaciji, kao i tretiranje subfertilnih (infertilnih) stanja koja se karakterišu oštećenjima mitohondrija i/ili izmenjenim redoks statusom spermatozoida.

7. Literatura

- Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*. 2008, 59: 2-11.
- Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*. 2004, 9: 338-347.
- Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*. 2005, 43: 963-974.
- Ahmed NA, Salem MH, El-Oksh HA, Pursel VG. Effect of incubation conditions, inhibitors and seminal plasma on protein synthesis in ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1984, 71: 213-219.
- Aitkin KJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987, 81: 459-469.
- Alcivar AA, Hake LE, Millette CF, Trasler JM, Hecht NB. Mitochondrial gene expression in male germ cells of the mouse. *Dev Biol*. 1989, 135: 263-271.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001, 1: 593-615.
- Alkan I, Simşek F, Haklar G, Kervancioğlu E, Ozveri H, Yalçın S, Akdaş A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol*. 1997, 157: 140-143.
- Allen MJ, Bradbury EM, Balhorn R. The chromatin structure of well-spread demembrated human sperm nuclei revealed by atomic force microscopy. *Scanning Microsc*. 1996, 10: 989-994.
- Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 1995, 42: 334-346.
- Amanai M, Brahmajosyula M, Perry AC. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol Reprod*. 2006, 75: 877-884.
- Amaral A, Ramalho-Santos J, St John JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod*. 2007, 22: 1585-1596.
- Appleton J. Arginine: clinical potential of a semi-essential amino. *Altern Med Rev*. 2002, 7: 512-522.

- Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. *Int J Biol Sci.* 2012, 8: 139-149.
- Aydin S, Inci O, Alagöl B. The role of arginine, indomethacin and kallikrein in the treatment of oligoasthenospermia. *Int Urol Nephrol.* 1995, 27: 199-202.
- Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril.* 1996, 65: 411-419.
- Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, Ricciardo-Lamonica G, Mazzanti L. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *J Androl.* 2004, 25: 245-249.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 218: 40-44.
- Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology.* 2007, 68: 147-155.
- Bolanos JP, Delgado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A. Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival. *Biochim Biophys Acta.* 2008, 1777: 789-793.
- Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, Liu JX, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking nitric oxide synthase. *Mol Med.* 1996, 2: 288-296.
- Buzadzic B, Korac A, Petrovic V, Korac B. Redox regulation of brown adipocytes: molecular and cellular targets in tissue remodeling. *Acta Physiol Pharamacol Serb.* 2006, 42: 141-159.
- Cai H, Davis ME, Drummond GR, and Harrison DG. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001, 21: 1571-1576.
- Chatterjee S, Laloraya M, Kumar PG. Free radical-induced liquefaction of ejaculated human semen: a new dimension in semen biochemistry. *Arch Androl.* 1997, 38: 107-111.
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 2001, 53: 135-159.
- Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Punekar S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med.* 2002, 48: 186-89.

- Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril*. 1992, 58: 1034-1039.
- de Lamirande E, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl*. 1993, 16: 21-25.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*. 1997, 2: 28-54.
- de Lamirande E, Lamothe G, Villemure M. Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*. 2009, 46: 1420-1427.
- de Lamirande E, Lamothe G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*. 2009, 46: 502-510.
- de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochem Biophys Acta*. 2008, 1784: 106-115.
- Diez-Sanchez C, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Perez-Martos A, Enriquez JA, Lopez-Perez MJ. Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins. *FEBS Lett* 2003, 553: 205-208.
- Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012, 10: 109.
- Duchon MR. Mitochondria and calcium: from cell signaling to cell death. *J Physiol*. 2000, 529: 57-68.
- Filipović MR, Duerr K, Mojović M, Simeunović V, Zimmermann R, Niketić V, Ivanović-Burmazović I. NO dismutase activity of seven-coordinate manganese(II) pentaazamacrocyclic complexes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008, 47: 8735-8739.
- Filipović MR, Koh AC, Arbault S, Niketić V, Debus A, Schleicher U, Bogdan C, Guille M, Lemaître F, Amatore C, Ivanović-Burmazović I. Striking inflammation from both sides: manganese(II) pentaazamacrocyclic SOD mimics act also as nitric oxide dismutases: a single-cell study. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010, 49: 4228-4232.
- Flohé L. Selenium in mammalian spermiogenesis. *Biol Chem*. 2007, 388: 987-995.
- Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Tøbergsten T, Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*. 1993, 8: 1863-1868.
- Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril*. 2006, 86: 1526-1430.
- Ghafourifar P, Richter C. Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH. *Biol Chem*. 1999, 380: 1025-1028.

- Giannattasio A, De Rosa M, Smeraglia R, Zarrilli S, Cimmino A, Coppola C, Panza G, Calafiore R, Colao A, Abete O, Lombardi G. Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J Endocrinol Invest.* 2002, 25: 983-986.
- Govers R, Oess S. To NO or not to NO: 'where?' is the question. *Histol Histopathol.* 2004, 19: 585-605.
- Grimble GK. Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids. *J Nutr.* 2007, 37: 1693-1701.
- Grossie VB. Citruline and arginine increase the growth of the ward colon tumor in parenterally fed rats. *Nutr Cancer.* 1996, 26: 91-97.
- Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 2006, 20: 411-416.
- Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril.* 2012, 97: 275-281.
- Hecht NB, Williams JL. Synthesis of RNA by separated heads and tails from bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 1978, 19: 573-579.
- Hellstrom WJ, Bell M, Wang R, Sikka SC. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil Steril.* 1994, 61: 1117-1122.
- Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr Pharm Des.* 2003, 9: 419-425.
- Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod.* 1999, 61: 575-581.
- Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J Androl.* 2001, 22: 349-356.
- Hsieh YY, Chang CC, Lin CS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sc.* 2006, 2: 23-29.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod.* 1998, 13: 1240-1247.
- Huie RE, Padmaja S. The reaction of nitric oxide with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993, 18: 195-199.
- Hüttemann M, Schmidt TR, Grossman LI. A third isoform of cytochrome c oxidase subunit VIII is present in mammals. *Gene.* 2003, 312: 95-102.
- Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod.* 2001, 64: 674-683.

- Iranzo O. Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: a balance between different factors. *Bioorg Chem.* 2011, 39: 73-87.
- Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients *Fertil Steril.* 1992, 57: 409-416.
- Józwik M, Józwik M, Kuczyński W, Szamatowicz M. Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. *Fertil Steril.* 1997, 68: 154-157.
- Kamel RM. Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *J Reprod Infertil.* 2013, 14: 96-109.
- Kao S, Chao HT, Wei YH. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod.* 1995, 52: 729-736.
- Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl.* 2002, 4: 97-103.
- Kaushal N, Bansal MP. Diminished reproductive potential of male mice in response to selenium-induced oxidative stress: involvement of HSP70, HSP70-2, and MSJ-1. *J Biochem Mol Toxicol.* 2009, 23: 125-136.
- Elder K, Dale B. Gametes and gametogenesis in: *In-Vitro Fertilization* (3rd Edition). Cambridge University Press, 2011, p 32.
- Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril.* 1995, 64: 825-831.
- Kim I, Lee KS, Choi YS, Hwang JS, Sohn HD, Jin BR. Cloning and characterization of the Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) cDNA from the mole cricket, *Gryllotalpa orientalis*. *Biotechnol Lett.* 2005, 27: 589-595
- Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod.* 1991, 6: 987-991.
- Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, 211: 375-381.
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010, 48: 425-435.

- Kumar G, Patel D, Naz RK. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res.* 1993, 39: 111-117.
- Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem.* 2008, 104: 1570-1579.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med.* 1997, 22: 643-656.
- Lee NP, Cheng CY. Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2008, 636: 172-185.
- Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2: 873-878.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 1997, 67: 142-147.
- Luiking YC, Weusten BL, Portincasa P, Van Der Meer R, Smout AJ, Akkermans LM. Effects of long-term oral L-arginine on esophageal motility and gall bladder dynamics in healthy humans. *Am J Physiol.* 1998, 274: 984-991.
- MacLaughlin J, Terner C. Ribonucleic acid synthesis by spermatozoa from the rat and hamster. *Biochem J.* 1973, 133: 635-639.
- MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol.* 1943, 138: 512-518.
- Marchetti C, Jouy N, Leroy-Martin B, Defosse A, Formstecher P, Marchetti P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Hum Reprod.* 2004, 19: 2267-2276.
- Marchetti C, Obert G, Defosse A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod.* 2002, 17: 1257-1265.
- Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000, 27: 313-319.
- Meniru GI. The male reproductive system, in Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction. Cambridge University Press, 2004, p: 3-9.
- Midzak AS, Chen H, Aon MA, Papadopoulos V, Zirkin BR. ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig cells. *Biology of Reproduction.* 2011, 84: 976-985.

- Miesel R, Jedrzejczak P, Sanocka D, Kurpisz MK. Severe antioxidant deficiency in human semen samples with pathological spermogram parameters. *Andrologia*. 1997, 29: 77-83.
- Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*. 2013, 379: 62-73.
- Miller D, Briggs D, Snowden H, Hamlington J, Rollinson S, Lilford R, Krawetz SA. A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. *Gene*. 1999, 237: 385-392.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*. 2010, 139: 287-301.
- Miraglia E, De Angelis F, Gazzano E, Hassanpour H, Bertagna A, Aldieri E, Revelli A, Ghigo D. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reproduction*. 2011, 141: 47-54.
- Miraglia E, Rullo ML, Bosia A, Massobrio M, Revelli A, Ghigo D. Stimulation of the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits human sperm chemotaxis in vitro. *Fertil Steril*. 2007, 87: 1059-1063.
- Miteva K, Valkov N, Goncharova-Peinova J, Kovachev K, Zlatarev S, Pironcheva G, Russev G. Electron microscopic demonstration of transcription of ram sperm chromatin. *Microbios*. 1995, 84: 91-96.
- Modi D, Shah C, Sachdeva G, Gadkar S, Bhartiya D, Puri C. Ontogeny and cellular localization of SRY transcripts in the human testes and its detection in spermatozoa. *Reproduction*. 2005, 130: 603-613.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 1989, 38: 1709-1715.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991, 43: 109-142.
- Muscoli C, Cuzzocrea S, Riley DP, Zweier J L, Thiemermann C, Wang Z-Q, Salvemini D. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br J Pharmacol*. 2003, 140: 445-460.
- Naz RK. Effect of actinomycin D and cycloheximide on human sperm function. *Arch Androl*. 1998, 41: 135-142.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 2003, 299: 896-899.

- O'Bryan MK, Zini A, Cheng CY, Schlegel PN. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. *Fertil Steril*. 1998, 70: 1143-1147.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*. 2006, 41: 528-540.
- Olson G E, Winfrey V P. Mitochondria-cytoskeleton interaction in the sperm midpiece. *J Struct. Biol* 1990, 103: 13-22.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P i Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet*. 2002, 360: 772-777.
- Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl*. 2005, 26: 70-74.
- Otasevic V, Korac A, Buzadzic B, Stancic A, Jankovic A, Korac B. Nitric oxide and thermogenesis-challenge in molecular cell physiology. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011, 3: 1180-1195.
- Park KG. The immunological and metabolic effects of L-arginine in human cancer. *Proc Nutr Soc*. 1993, 52: 387-401.
- Patel AB, Srivastava S, Phadke RS, Govil G. Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: an NMR study. *Biophys J*. 1998, 75: 1522-1528.
- Perera DM, Katz M, Heenbanda SR, Marchant S. Nitric oxide synthase inhibitor NG-monomethyl-L-arginine preserves sperm motility after swim-up. *Fertil Steril*. 1996, 66: 830-833.
- Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha II, Yanez A, Burzio LO. Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989, 158: 272-278.
- Petrović V, Korać A, Buzadžić B, Vasilijević A, Janković A, Micunović K, Korać B. Nitric oxide regulates mitochondrial re-modelling in interscapular brown adipose tissue: ultrastructural and morphometric-stereologic studies. *J Microsc*. 2008, 232: 542-548.
- Petrović V, Buzadžić B, Korać A, Vasilijević A, Janković A, Korać B. NO modulates the molecular basis of rat interscapular brown adipose tissue thermogenesis. *Comp Biochem Physiol C*. 2010a, 152: 147-159.
- Petrović V, Buzadžić B, Korać A, Korać B. Antioxidative defense and mitochondrial thermogenic response in brown adipose tissue. *Genes Nutr*. 2010b, 5: 225-235.
- Petrović V, Korać A, Buzadžić B, Korać B. The effects of L-arginine and L-NAME supplementation on redox-regulation and thermogenesis in interscapular brown adipose tissue. *J Exp Biol*. 2005, 208: 4263-4271.

- Premkumar E, Bhargava PM. Transcription and translation in bovine spermatozoa. *Nat New Biol.* 1972, 240: 139-143.
- Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, de Oliveira GS, Garcia AA, Barratt CL, Harper CV. Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci.* 2008, 13: 5623-5637.
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update.* 2009, 15: 553-572.
- Revelli A, Costamagna C, Moffa F, Aldieri E, Ochetti S, Bosia A, Massobrio M, Lindblom B, Ghigo D. Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Reprod.* 2001, 64: 1708-1712.
- Revelli A, Soldati G, Costamagna C, Pellerey O, Aldieri E, Massobrio M, Bosia A, Ghigo D. Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction. *J Cell Physiol.* 1999, 178: 85-92.
- Richard, Kristin. Lopez. Human Reproductive Biology, 4th Edition, Academic press, 2013, p 110.
- Riley DP, Schall OF. Structure-activity studies and design of synthetic superoxide dismutase (SOD) mimetics as therapeutics. *Adv Inorg Chem.* 2007, 59: 233-263.
- Roessner C, Paasch U, Glander HJ, Grunewald S. Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. *Andrologia.* 2010, 42: 132-137.
- Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod.* 1999, 14: 1028-1033.
- Rossato M. Endocannabinoids, sperm functions and energy metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2008, 86: 31-35.
- Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod.* 1995, 10: 1786-1790.
- Ruiz-Pesini E, Díez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, López-Pérez MJ. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem.* 1998, 44: 1616-1620.
- Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez C, Alvarez E, Enríquez JA, López-Pérez MJ. Seminal quality correlates with mitochondrial functionality. *Clin Chim Acta.* 2000 Oct; 300: 97-105.

- Salvemini D, Mazzon E, Dugo L, Riley DP, Serraino I, Caputi AP, Cuzzocrea S. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. *Br J Pharmacol*. 2001, 132: 815-827.
- Salvemini D, Muscoli C, Riley DP, Cuzzocrea S. Superoxide dismutase mimetics. *Pulm Pharmacol Ther*. 2002, 15: 439-447.
- Salvemini D, Doyle TM, Cuzzocrea S. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans*. 2006, 34: 965-670.
- Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Chelmonska-Soyta AC, Kurpisz M. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. *Int J Androl*. 1997, 20: 255-264.
- Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Kurpisz MK. Oxidative stress and male infertility. *J Androl*. 1996, 17: 449-454.
- Schulman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S, Ernst KV, Kelemen MD, Townsend SN, Capriotti A, Hare JM, Gerstenblith G. L-arginine therapy in myocardial infarction. The Vascular Interaction with Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA*. 2006, 295: 58-64.
- Scibona M, Meschini P, Capparelli S, Pecori C, Rossi P, Menchini Fabris GF. L-arginine and male infertility. *Minerva Urol Nefrol*. 1994, 46: 251-253.
- Searles CD. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006, 291: 803-816.
- Shah C, Modi D, Sachdeva G, Gadkar S, D'Souza S, Puri C. N terminal region of progesterone receptor B isoform in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2005, 28: 360-371.
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002, 77: 873-882.
- Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Jesudasan R, Gopalan B, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E. Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013, 11: 38-58.
- Sharma R, Biedenharn K.R, Fedor J.M, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013, 11: 66-81.
- Sinha Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003a, 85: 175-182.

- Sinha Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, Vera Y, Rodriguez S, Yen PH, Soeng K, Wang C, Swerdloff RS. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testes. *Endocrinology*. 2003b, 144: 3167-3175.
- Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo Peregrin P, Freitas A, Paiva A, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PloS One*. 2011, 6: e18112.
- Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia*. 2004, 47: 1727-1734.
- Srivastava S, Desai P, Coutinho E, Govil G. Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 2000, 32: 127-135.
- St John JC, Jokhi RP, Barratt CL. The impact of mitochondrial genetics on male infertility. *Int J Androl*. 2005, 28: 65-73.
- Stančić A, Korać A, Buzadžić B, Otašević V, Janković A, Vučetić M, Korać B. L-Arginine in nutrition: multiple beneficial effects in the etiopathology of diabetes. *J.Nutr Ther*. 2012, 1: 114-131.
- Stančić A, Otašević V, Janković A, Vučetić M, Ivanović-Burmazović I, Filipović MR, Korać A, Markelić M, Veličković K, Golić I, Buzadžić B, Korać B. Molecular basis of hippocampal energy metabolism in diabetic rats: the effects of SOD mimic. *Brain Res Bull*. 2013, 99: 27-33.
- Stanislavov R, Nikolova V, Rohdewald P. Improvement of seminal parameters with Prelox: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Phytother Res*. 2009, 23: 297-302.
- Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, Kliesch S, Bergman M, Weidner W. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum. Reprod*. 2008, 23: 11-16.
- Stocco D, McPhaul M. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (3rd Edition), Academic Press/Elsevier, 2006, Physiology of testicular steroidogenesis, pp 977-1016.
- Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ. Prediction of the in-vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF. *Hum Reprod*. 1996, 11: 1030-1034.

- Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl.* 1996, 17: 530-537.
- Takano H, Lim HB, Miyabara Y, Ichinose T, Yoshikawa T, Sagai M. Oral administration of L-arginine potentiates allergen-induced airway inflammation and expression of interleukin-5 in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 286: 767-771.
- Tankersley RW. Amino acid requirements of herpes simplex virus in human cells. *J Bacteriol.* 1964, 87: 609-613.
- Tome LA, Yu L, de Castro I, Campos SB, Seguro AC. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant.* 1999, 14: 1139-1145.
- Twaina-Bechor E, Bartoov B. The relationship between ejaculated ram sperm mitochondrial protein synthesis and motility. *Andrologia.* 1994, 26: 351-355.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 1999, 285: 1393-1396.
- Vallance P, Leiper J. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov.* 2002, 1: 939-950.
- Vasiljević A, Buzadzić B, Korać A, Petrović V, Janković A, Korać B. Beneficial effects of L-arginine nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan. *J Physiol.* 2007, 584: 921-933.
- Vasiljevic A, Vojcic L, Dinulovic I, Buzadzic B, Korac A, Petrovic V, Janković A, Korać B. Expression pattern of thermogenesis-related factors in interscapular brown adipose tissue of alloxan-treated rats: beneficial effect of L-arginine. *Nitric Oxide.* 2010, 23: 42-50.
- Vucetic M, Otasevic V, Korac A, Stancic A, Jankovic A, Markelic M, Golić I, Velickovic K, Buzadzic B, Korac B. Interscapular brown adipose tissue metabolic reprogramming during cold acclimation: interplay of HIF-1 α and AMPK α . *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1810: 1252-1261.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 1999, 283: 1482-1488.
- Weinberg JB, Doty E, Bonaventura J, Haney AF. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil Steril.* 1995, 64: 408-413.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th Edition), Cambridge University Press, 2010.
- Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY. Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. *Arch Androl.* 2004, 50: 173-179.

- Yan W, Morozumi K, Zhang J, Ro S, Park C, Yanagimachi R. Birth of mice after intracytoplasmic injection of single purified sperm nuclei and detection of messenger RNAs and MicroRNAs in the sperm nuclei. *Biol Reprod.* 2008, 78: 896–902.
- Yeatman TJ, Risley GL, Brunson ME. Depletion of dietary arginine inhibits growth of metastatic tumor. *Arch Surg.* 1991, 126: 1376-1382.
- Zalenskaya IA, Bradbury E i Zalensky AO. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 279: 213-218.
- Zini A, Abitbol J, Girardi SK, Schulsinger D, Goldstein M, Schlegel PN. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia-reperfusion injury to testes. *Arch Androl.* 1998, 41: 57-65.
- Zini A, Abitbol J, Schulsinger D, Goldstein M, Schlegel PN. Restoration of spermatogenesis after scrotal replacement of experimentally cryptorchid rat testes: assessment of germ cell apoptosis and eNOS expression. *Urology.* 1999, 53: 223-227.
- Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl.* 1995, 16: 424-31.
- Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl.* 1993, 16: 183-188.
- Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testes, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod.* 1996, 55: 935-941.

LISTA SKRAĆENICA:

BSA	goveđi serum albumin (<i>engl.</i> bovine serum albumine)
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzena
cDNK	komplementarna DNK (<i>engl.</i> complementary DNA)
COX	citohrom <i>c</i> oksidaza, kompleks IV oksidativne fosforilacije (<i>engl.</i> cytochrome <i>c</i> oxidase)
CuZnSOD	bakar cink superoksid dismutaza (<i>engl.</i> copper zinc superoxide dismutase)
Cyt <i>b</i>	citohrom <i>b</i> (<i>engl.</i> cytochrome <i>b</i>)
Cyt <i>c</i>	citohrom <i>c</i> (<i>engl.</i> cytochrome <i>c</i>)
Daf2-DA	diaminofluorescein diacetat (<i>engl.</i> diaminofluorescein diacetate)
eNOS	endotelska azot oksid sintaza (<i>engl.</i> endothelial nitric oxide synthase)
GADPH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (<i>engl.</i> glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GSH	glutation (<i>engl.</i> glutathione)
GSH-Px	glutation peroksidaza (<i>engl.</i> glutathione peroxidase)
H₂O₂	vodonik peroksid (<i>engl.</i> hydrogen peroxide)
HO·	hidroksil radikal
ICSI	intracitoplazmatsko injektiranje (ubacivanje) spermatozoida (<i>engl.</i> intracytoplasmic sperm injection)
iNOS	inducibilna azot oksid sintaza (<i>engl.</i> inducible nitric oxide synthase)
IVF	<i>in vitro</i> oplođenje; <i>in vitro</i> fertilizacija
MnSOD	mangan superoksid dismutaza (<i>engl.</i> Mn superoxide dismutase)
Mowiol®	balzam koji čuva fluorescenciju
Mt-DNK	mitohondrijalna DNK
MT-G	MitoTracker®Green FM
Ndufa	ubikinon (<i>engl.</i> NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex)
nNOS	neuronalna azot oksid sintaza (<i>engl.</i> neuronal nitric oxide synthase)
NO	azot oksid (<i>engl.</i> nitric oxide)
NOX	nikotinamid adenin dinukleotide fosfat-oksidaza (NAD(P)H oksidaza)
O₂⁻	superoksid anjon radikal (<i>engl.</i> superoxide anion radical)
OXPHOS	oksidativna fosforilacija (<i>engl.</i> oxidative phosphorylation)
RNS	reaktivne vrste azota (<i>engl.</i> reactive nitrogen species)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (<i>engl.</i> reactive oxygen species)
RT-PCR	lančana reakcija polimerizacije u realnom vremenu (<i>engl.</i> real time polymerase chain reaction)
SDS	natrijum-dodecil sulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)
SOD	superoksid dismutaza (<i>engl.</i> superoxide dismutase)
TBS-T	Tris-boratni pufer sa dodatkom detergenta Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (<i>engl.</i> N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine)
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (<i>engl.</i> World Health Organization)

BIOGRAFIJA AUTORA

Biljana Macanović rođena je 12. jula 1976. godine u Beogradu.

Osnovnu školu završila je u Mladenovcu, a srednju medicinsku školu „Nadežda Petrović“ u Zemu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1995/1996, na smeru Biologija, uže izborne oblasti Citologija, histologija i embriologija. Diplomirala je 2002. godine sa opštim uspehom 8.35 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na programu Biologija, uže naučne oblasti Biologija ćelija i tkiva, upisala je školske 2007/2008. godine.

Radila je kao profesor biologije, u periodu od 2003-2006 godine. U Beogradu na Ginekološko akušerskoj klinici „Narodni front“, Odeljenja za artefijalnu reproduktivnu tehniku sa dnevnom bolnicom je zaposlena od 2006. godine na mestu biologa-embriologa, gde je počela i usavršila se u tehnikama biomedicinski potpomognutog oplodjenja i realizovala deo eksperimentalnog dela doktorske disertacije. Prisustvovala je stručnim radionicama: COOK Media Symposium, Beograd, Srbija, 2007; Vitifikacija IGA KCS, Srbija, 2007; Vitification, IVF Clinic MEDIMALL, 2008, Athens, Greece; Usage of Cook sequential media, Vitification (what is important to look at) Culture Systems with MINC, Fertilitätszentrum Döbling, Wien, Austria, 2013 i brojnim internacionalnim seminarima.

Član je Evropskog udruženja za humanu reprodukciju i embriologiju (European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE), član Udruženja srpskih embriologa i član Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju.

Do danas proistekle rezultate objavila je u koautorstvu: 2 rada u međunarodnim časopisima, 1 rad u nacionalnom časopisu, 10 saopštenja sa međunarodnog skupa štampanih u celini, 2 saopštenja sa međunarodnog skupa štampanih u vidu abstrakta i 2 saopštenja sa skupa nacionalnog značaja štampanih u izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Биљана М. Мацановић

број уписа Б3037/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекат миметика супероксид дисмутазе на митохондријални и функциони

статус хуманих сперматозоида

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07.08.2015.

Мацановић Биљана

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Биљана М. Мацановић

Број уписа Б3037/2007

Студијски програм Биологија ћелија и ткива

Наслов рада Ефекат миметика супероксид дисмутазе на митохондријални и
функционални статус хуманих сперматозоида

Ментори: Др Александра Кораћ, редовни професор
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Весна Оташевић, виши научни сарадник
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“
Универзитет у Београду

Потписани Биљана М. Мацановић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 07.08.2015.

Мацановић Биљана

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Ефекат миметика супероксид дисмутазе на митохондријални и функционални статус хуманих сперматозоида“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 07.08.2015.

Мацановић Билана